



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

Efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Porphyromonas gingivalis*

ATCC 33277

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Cirujano Dentista

AUTORAS:

Ramirez Pozo, Tabata Sofia (ORCID: 0000-0003-4022-2620)

Rujel Ramos, Estefany Fernanda (ORCID: 0000-0001-8260-3662)

ASESOR:

Dr. Ruiz Barrueto, Miguel Angel (ORCID: 0000-0002-3373-4671)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades infecciosas y transmisibles

PIURA – PERÚ

2021

Dedicatoria

La presente tesis la dedicamos a Dios, ya que gracias a él vamos logrando poco a poco nuestras metas como futuras profesionales, asimismo a nuestra familia por brindarnos su apoyo y esfuerzo de vernos mejorar día a día en nuestra carrera universitaria.

Agradecimiento

A la Universidad Cesar Vallejo, en especial a nuestro asesor el Dr. Miguel Angel Ruiz Barreto por brindarnos su apoyo, tiempo y disposición durante el desarrollo de nuestra tesis, además le agradezco a mi compañera por el esfuerzo y sacrificio que entrego para hacer posible la culminación de la presente investigación.

Índice de contenidos

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de tablas	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. MÉTODOLOGÍA.....	12
3.1. Tipo y diseño de investigación	12
3.2. Variables y operacionalización.....	12
3.3. Población (criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis	12
12	
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	13
3.5. Procedimientos	13
3.6. Método de análisis de datos	15
3.7. Aspectos éticos.....	15
IV. RESULTADOS	16
V. DISCUSIÓN.....	21
VI. CONCLUSIONES.....	25
VII. RECOMENDACIONES	26
REFERENCIAS.....	27
ANEXOS	35
ANEXO 1	35
ANEXO 2	36

ANEXO 3	37
ANEXO 4	38
ANEXO 5	45

Índice de tablas

Tabla 1.....	16
Tabla 2.....	17
Tabla 3.....	18
Tabla 4.....	19
Tabla 5.....	20

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo comparar el efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Fue una investigación básica con diseño experimental verdadero. Se evaluó el efecto *in vitro* de dos concentraciones de las cepas certificadas de los probióticos *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus casei* ATCC 393. La sustancia utilizada como control positivo fue gluconato de clorhexidina 0,12%. El método de difusión en disco fue utilizado para la determinación del efecto inhibitorio. Los resultados revelaron que la concentración $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *L. acidophilus* ATCC 4356 formó un halo de inhibición de 6,87 mm. El efecto de la concentración $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *L. casei* ATCC 393 y el de la concentración $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de *L. acidophilus* ATCC son estadísticamente iguales. Lo mismo ocurre con la concentración $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de *L. casei* ATCC 393 y la concentración $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *B. animalis* ATCC 25527 y de *L. lactis* ATCC 11454 ($p=0,860$). La concentración $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de *B. animalis* ATCC 25527 y *L. lactis* ATCC 11454 mostraron el mismo efecto inhibitorio. Ninguna concentración de todos los probióticos evaluados superó el efecto de la clorhexidina 0,12%. Concluimos que todos los probióticos mostraron efecto inhibitorio sobre *P. gingivalis* ATCC 33277 de tipo bacteriostático mientras que el control positivo mostró efecto de tipo bactericida.

Palabras claves: *Porphyromonas gingivalis*, Probióticos, Antibacterianos, Antibiosis.

Abstract

The present study aimed to compare the in vitro effect of probiotic strains against *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. It was a basic investigation with true experimental design. The in vitro effect of two concentrations of the certified strains of the probiotics *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactobacillus casei* ATCC 393. The substance used as positive control was 0.12% chlorhexidine gluconate. The disk diffusion method was used to determine the inhibitory effect. The results revealed that the 1.5×10^8 CFU / mL concentration of *L. acidophilus* ATCC 4356 formed an inhibition halo of 6.87 mm. The effect of the concentration 1.5×10^8 CFU / mL of *L. casei* ATCC 393 and that of the concentration 1.5×10^9 CFU / mL of *L. acidophilus* ATCC are statistically equal. The same occurs with the 1.5×10^9 CFU / mL concentration of *L. casei* ATCC 393 and the 1.5×10^8 CFU / mL concentration of *B. animalis* ATCC 25527 and *L. lactis* ATCC 11454 ($p = 0.860$). The concentration 1.5×10^9 CFU / mL of *B. animalis* ATCC 25527 and *L. lactis* ATCC 11454 shows the same inhibitory effect. No concentration of all the probiotics evaluated exceeded the effect of 0.12% chlorhexidine. We conclude that all probiotics showed an inhibitory effect on *P. gingivalis* ATCC 33277 of a bacteriostatic type, while the positive control showed a bactericidal effect.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, Probiotics, Antibacterials, Antibiosis.

I. INTRODUCCIÓN

La cavidad bucal tiene múltiples superficies, cada una de ellas es un entorno favorable para el crecimiento de microorganismos, ya que proporcionan potencial de hidrógeno (pH), humedad, temperatura y nutrientes adecuados para su desarrollo.¹ Se pueden encontrar bacterias comensales que integran la microbiota benéfica del huésped y son para mantener la homeostasis bucal. Sin embargo, también existen bacterias patógenas que son responsables del progreso de las enfermedades bucales, como la caries dental y la enfermedad periodontal, consideradas las afecciones más prevalentes en los seres humanos no solo perjudicando su salud oral sino también la salud general.²

Las enfermedades periodontales son consideradas tradicionalmente como patologías inflamatorias crónicas de origen multifactorial. Son definidas como un conjunto de trastornos asociados a la inflamación del tejido periodontal, que genera la destrucción del ligamento periodontal y reabsorción del hueso alveolar.^{3,4} Las bacterias asociadas a esta enfermedad son *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema Denticola*.⁵ Según informes, 3.900 millones de personas a nivel mundial padecen enfermedad periodontal, siendo la prevalencia de gingivitis del 99% y de periodontitis 30% en adultos.⁶

Las manifestaciones clínicas incluyen formación de bolsas periodontales, recesión gingival, sangrado, pérdida de inserción, movilidad dental y disfunción masticatoria.⁷ Estas condiciones generan discapacidad, trastornos del habla y baja autoestima por ello es importante llevar a cabo un tratamiento inicial como la implementación de hábitos de higiene oral por parte del paciente, tartrectomía manual o ultrasónica, eliminación profesional de la biopelícula microbiana subgingival, que se realiza a través de procedimientos mecánicos de destartraje y pulido radicular en zonas con sondaje periodontal profundo y actualmente una de las terapias no invasivas incluyen el uso de probióticos utilizados como complemento para maximizar los beneficios de la terapia periodontal.^{8,3,9,10}

Los probióticos son organismos vivos no patógenos que al ser suministrados en proporciones suficientes, otorgan beneficios para la salud de quien lo consume.^{6,11,12,4,13,14} Estos pueden reducir el número de patógenos asociados con

la caries dental, enfermedad periodontal, halitosis y otras enfermedades bucales.¹⁰ Son seguros para el consumo humano y pueden mejorar la salud oral.^{6,15} Se han utilizado cepas probióticas del género *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* asociados con la salud periodontal y con éxito en el tratamiento en pacientes con periodontitis.^{16,13} Se ha observado que tienen el potencial de inhibir el desarrollo de bacterias periodontopatógenas.^{14,17}

La literatura revisada recomienda que el uso de los probióticos es beneficioso para el tratamiento de la terapia periodontal, sin embargo, se necesitan más estudios que demuestren resultados favorables, es por ello que se genera el siguiente cuestionamiento ¿Cuál es el efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277?

Este estudio tiene como finalidad buscar alternativas de tratamiento para controlar y/o prevenir el desarrollo de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 principal bacteria patógena y agente causal de la enfermedad periodontal. Es por ello que se decide emplear determinadas cepas probióticas como *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527, *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus Casei* ATCC 393 porque se ha observado que poseen un efecto antimicrobiano según estudios *in vitro* realizados. Debido a la alta prevalencia de esta enfermedad, esperamos aportar con esta investigación información necesaria para que se pueda considerar el uso de los probióticos como complemento adicional en la terapia periodontal en un futuro próximo.

Si bien es cierto hay pocos estudios *in vitro* de la efectividad de estos probióticos contra las bacterias periodontopatógenas, los resultados son muy prometedores, ya que estos llegan a tener una actividad antimicrobiana y disminuyen los recuentos de la bacteria estudiada para así utilizarla como método de prevención de esta enfermedad prevalente, sin embargo, aún son necesarias más investigaciones para validar la información recopilada.

En ese sentido para responder el problema de investigación se planteará el siguiente objetivo general: Comparar el efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. El cual se fundamenta en los siguientes

objetivos específicos: Determinar el efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Determinar el efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Determinar el efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Determinar el efecto *in vitro* *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Según los datos evidenciados se propusieron las siguientes hipótesis:

H1: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 posee efecto antibacteriano contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

H2: *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 posee efecto antibacteriano contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

H3: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 posee antibacteriano contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

H4: *Lactobacillus casei* ATCC 393 posee efecto antibacteriano contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

II. MARCO TEÓRICO

Santos et al¹⁸ (2020) en Brasil tuvo como objetivo evaluar la efectividad antimicrobiana de *L. reuteri* contra bacterias periodontopatógenas. Fue un estudio experimental in vivo e in vitro. Se cultivó durante cinco días *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* en Agar Brucella mientras que *L. reuteri* se cultivó sobre caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) durante 24 h en condiciones anaeróbicas. Los grupos control se desarrollaron empleando *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* en PBS o glicerol. Los tubos se incubaron sobre condiciones anaeróbicas durante 72h a 37°C. Para determinar las UFC, prepararon diluciones y se sembró en agar de cultivo a los microorganismos. Durante cinco días se incubaron placas de *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* mientras que las placas de *L. reuteri* en un periodo de tres días. Reportaron que todas las preparaciones disminuyeron las UFC de *F. nucleatum*, aunque solo *L. reuteri* in vivo inhibió el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*. Todos los tratamientos aminoraron el desarrollo de bacterias periodontopatógenas in vivo. Concluyeron que *L. reuteri* tiene efectos antimicrobianos in vitro.

Invercini et al¹⁹ (2020) en EE.UU. Su objetivo fue evaluar los efectos y las propiedades antimicrobianas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 contra bacterias periodontopatógenas. Fue un estudio experimental in vitro. Su actividad antimicrobiana se evaluó frente a *P. gingivalis* W83, *P. intermedia* ATCC 25611, *F. nucleatum* ATCC 25586 y *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33393. Para ello, *B. lactis* HN019 se cultivó previamente en caldo de MRS. Se inocularon en pocillos de 15 mm en agar de soja tríptico, previamente sembrado con los microorganismos. Después de la pre-incubación durante 30 min a temperatura ambiente, las placas se incubaron a 37°C durante 72h en condiciones anaeróbicas (*P. Gingivalis*, *P. intermedia*, y *F. nucleatum*) y en condiciones microaerófilas (*A. actinomycetemcomitans*). Los resultados indicaron *B. lactis* HN019 mostró un potencial antimicrobiano contra las bacterias periodontopatógenas. Concluyendo que las propiedades inmunológicas y antimicrobianas de *B. lactis* HN019 lo convierten en un probiótico potencial para ser utilizado en la terapia periodontal no quirúrgica.

Chen et al²⁰ (2020) en Taiwán su objetivo fue evaluar la eficacia antipatogénica de diferentes especies de probióticos y su papel potencial para mejorar la salud bucal. Fue un estudio experimental in vitro. Se utilizó un método de recubrimiento de agar modificado para estudiar las actividades antimicrobianas de los probióticos contra patógenos bucales. La bacteria *S. mutans* se cultivó en caldo de soja tríptico (TSB), *P. gingivalis* y *F. nucleatum* subsp. polymorphum se cultivaron en TSB suplementado con 5% de sangre de oveja, y finalmente *A. actinomycetemcomitans* se cultivó en caldo de cerebro-corazón. Todos los patógenos se incubaron a 37 ° C durante 48 h. Los resultados mostraron que las cepas probióticas *L. salivarius* subsp. *salicinius*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* tiene un gran potencial de uso en el desarrollo de alimentos funcionales para mejorar la salud bucal. Se concluyó que los probióticos pueden proporcionar una protección fuerte y a largo plazo en la cavidad bucal.

Routh et al²¹ (2019) en la India. Su objetivo fue conocer la acción de los probióticos sobre *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia*. Fue un estudio experimental in vitro. Las cepas probióticas empleadas fueron *L. acidophilus* y *S. salivarius* disponible en la presentación comercial neoflora. Se utilizó el método del pocillo para evaluar la acción de los probióticos. Este procedimiento se llevó a cabo para los cuatro organismos de prueba. Luego se incubaron durante 24 y 48 h. Los resultados indicaron una acción significativa de los probióticos sobre los *S. mutans* y *P. gingivalis* excepto para *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*. Se concluyó que hubo un efecto antimicrobiano de los probióticos *L. acidophilus* y *S. salivarius* sobre los microbios comunes asociados con la caries dental y las enfermedades periodontales.

Fernández et al²² (2019) en España. Su objetivo fue evaluar los efectos beneficiosos in vitro de *Streptococcus dentisani* como probiótico oral para enfermedades periodontales. Fue un estudio experimental in vitro. *Streptococcus dentisani* 7746 fue escogido como probiótico oral contra tres diferentes patógenos periodontales, *S. mutans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Se utilizó la PCR para determinar los niveles de la bacteria oral *Streptococcus dentisani* 7746 en lengua,

saliva, placa supragingival y subgingival. Se midió la inhibición de *Porphyromonas gingivalis*, el crecimiento y la unión de *Fusobacterium nucleatum* a fibroblastos gingivales humanos. Teniendo como resultado una fuerte acción inhibidora de *S. dentisani* contra los patógenos periodontales en cultivo puro mediante mecanismos de competencia, adherencia y desplazamiento. Concluyeron que *S. dentisani* destaca como terapia adyuvante en el manejo de las enfermedades periodontales.

Widyarman et al²³ (2019) en Indonesia. Su objetivo fue evaluar los efectos in vitro de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei* sobre la formación de biopelículas de los principales patógenos orales, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Fue un estudio experimental in vitro. Se aislaron las cepas de *L. casei* Shirota y *L. reuteri* ATCC 55730 y se cultivaron en caldo de MRS. Las cepas de *P. gingivalis* ATCC 33277 y *S. mutans* ATCC 25175 se sembraron en un medio de cultivo líquido de cerebro-corazón y se utilizaron para la formación de biopelículas en una plataforma de microplacas de 96 pocillos de 15 min a 24 h. Los resultados mostraron una reducción significativa en las biopelículas de *S. mutans* y *P. gingivalis* después del tratamiento con los probióticos *L. reuteri* y *L. casei* en todos los tiempos de incubación ($P < 0.05$). Concluyeron que *L. casei* cepa Shirota y *L. reuteri* ATCC 55730 tienen una actividad antibiofilm contra *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Cornacchione et al²⁴ (2019) en EE.UU. Su objetivo fue evaluar el efecto inhibidor de *Lactobacillus delbrueckii* contra *P. gingivalis*. Fue un estudio in vitro. Las proteínas inhibidoras de los extractos de *L. delbrueckii* STYM1 son purificadas mediante precipitaciones con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio aniónico y de filtración en gel. Se demostró que el piruvato oxidasa purificada y catalíticamente activa puede inhibir el crecimiento de *P. gingivalis*. Además, se aislaron mutantes de transposones de *P. gingivalis* en el gen *feoB2* (PG_1294) obteniendo que son resistentes a la muerte por inhibidor de *L. delbrueckii*. Se concluyó que las cepas *L. delbrueckii* son eficaces en la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal asociada a *P. gingivalis*.

Elavarasu et al²⁵ (2016) en la India, tuvieron como objetivo evaluar la eficacia de los probióticos en *Porphyromonas gingivalis*. Fue un estudio in vitro para analizar

la efectividad del probiótico BIFILAC sobre *P. gingivalis*. La eficacia antibacteriana se determinó por el método de disco difusión con las concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL y la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de microdilución con las concentraciones de 25 a 100 µg / mL. Para el primer método obtuvieron que a la concentración de 20 µg/mL se obtuvo la máxima inhibición (22 mm). La CMI fue 25 µg/mL. Concluyeron que el probiótico BIFILAC tiene un efecto antimicrobiano contra *P. gingivalis*.

En ese sentido, la periodoncia es una disciplina de la estomatología que se encarga del estudio de la prevención, diagnóstico y tratamiento de los tejidos de soporte dental. Las patologías periodontales son infecciones multifactoriales que están ligadas a la formación y permanencia de la biopelícula subgingival en la superficie del diente.³ La gingivitis es la principal manifestación patológica de la respuesta inflamatoria del sujeto a la biopelícula, que se caracteriza por la inflamación de las encías sin pérdida de inserción de tejido conjuntivo. Si se retira la biopelícula, la enfermedad es reversible, pero si no se trata, se hace crónica progresando a una periodontitis, que se caracteriza por la presencia de inflamación gingival, que posteriormente destruye de forma irreversible el tejido de inserción del diente, convirtiéndose en uno de los principales motivos de pérdida dentaria.²⁶ Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que las periodontopatías graves afectan a casi el 10% de la población mundial.

Mediante métodos de biología molecular se han reconocido de 800 a 1000 especies de bacterias presentes en la cavidad bucal. Solo 50 de ellas están asociadas a la etiología de la enfermedad periodontal.¹ Estas bacterias orales comensales son responsables del inicio y propagación de la enfermedad a través del proceso de disbiosis o desequilibrio microbiano.² Las enfermedades periodontales son causadas por múltiples bacterias gramnegativas microaerófilas y anaerobias, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* y *F. nucleatum*.²⁷ Estas cuentan con diversos factores de virulencia que les permiten colonizar en sitios subgingivales, evadir la respuesta inmune y por lo tanto causar daño tisular.²⁸ Esta patología se asocia también a diversas enfermedades sistémicas como diabetes, enfermedades cardiovasculares y respiratorias.²⁹

Porphyromonas Gingivalis es un cocobacilo gramnegativo que habita en el área subgingival. Está asociado a la aparición y progreso de la periodontitis. Sus factores de virulencia incluyen lipopolisacáridos (LPS), hemaglutininas, gingipaínas y fimbrias, importantes en la inducción de respuesta inmunoinflamatorias y reabsorción ósea alveolar.^{30,31} Las fimbrias son apéndices filamentosos adhesivos con propiedades proteicas, su componente principal es FimA, una proteína que puede medir la adhesión de otras cepas bacterianas y la matriz extracelular de células con inmunidad innata. Los pesos moleculares de las proteínas FimC, FimD y FimE son 50, 80, y 60 kDa respectivamente, que representan el 1% de los componentes de la fimbria. Además, están compuestas por subunidades de fimbrilina, ubicadas en la superficie celular, lo que permite que las bacterias se adhieran al tejido periodontal y a la película adquirida durante la formación y consolidación de esta.³² La anatomía y fisiología de las bolsas y surco periodontal los convierten en un sitio que resiste el efecto limpiador de la saliva, soporta la actividad mecánica de la lengua, y se convierte en un área que retiene bacterias. Estas se alimentan de líquido gingival, que contiene carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales que pueden promover el crecimiento de la microbiota del surco.³¹

Una de las finalidades del tratamiento periodontal es reducir o eliminar microorganismos patógenos asociados a la enfermedad, esto se logra mediante una implementación de hábitos de higiene por parte de los pacientes y un desbridamiento mecánico para eliminar los depósitos supragingivales y subgingivales. También se pueden emplear varios tratamientos quirúrgicos para facilitar la modificación del entorno periodontal y reducir el riesgo de recolonización por patógenos periodontales.³³ El pulido y alisado radicular (PAR) es principal tratamiento para la periodontitis en zonas con sondaje periodontal profundo, que busca controlar la infección, eliminando los microorganismos periodontopatógenos que se encuentran en la biopelícula subgingival y en otras zonas, estableciendo un grupo microbiano compatible con la salud del hospedero.⁸ En algunos casos, el tratamiento de la enfermedad periodontal puede incluir el uso complementario de antimicrobianos como la azitromicina, amoxicilina más metronidazol o moxifloxacina lo cual se ha visto comprometido por la resistencia a antibióticos.^{34,35} Por lo tanto, es necesario encontrar un nuevo

paradigma sobre tratamiento periodontal. La bibliografía científica comunica que el uso de probióticos provocaría una disminución de los microorganismos patógenos presentes en la placa subgingival posterior al tratamiento periodontal, además producen una reducción de citocinas que generan el proceso inflamatorio.

Los probióticos son microorganismos no patógenos que, al ser suministrados en proporciones suficientes, benefician la salud del individuo.³⁶ Desde este punto de vista, nació el concepto bacterioterapia. Este término se usa cuando una cepa inofensiva se instaure en la microbiota del huésped para mantener o reconstruir el microbioma natural interfiriendo y/o inhibiendo otros microorganismos, generalmente patógenos.³⁷ La mayoría de los probióticos son bacterias grampositivas pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.³⁶ Estas bacterias han demostrado ser seguras para su uso por humanos, haciendo posible el desarrollo de productos comerciales a partir de ellos. Se les ha incorporado como complemento en alimentos como leche, helado, queso y yogurt ^{37,38} y también en otros productos como la goma de mascar, tabletas masticables y colutorios.³⁹

Se ha publicado que las cepas probióticas como *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* se considera un probiótico potencial porque posee propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas, disminuye la placa, los índices gingivales, además de promover un efecto protector contra la pérdida de hueso alveolar y de inserción del tejido conectivo atribuible a la periodontitis.^{13,40} Por su parte, *Lactococcus lactis ssp. Lactis*, *Lactobacillus Acidophilus* y *Lactobacillus Casei* poseen diferentes efectos inhibidores sobre el crecimiento de *S. mutans*.^{41,42}

Para tener un efecto beneficioso en la cavidad bucal, los probióticos deben formar una biopelícula que actúe como revestimiento protector de los tejidos bucales contra las enfermedades orales o adaptarse adecuadamente al tejido oral y entrar en contacto con el microorganismo patógeno para competir con él y se produzca un antagonismo natural. La adhesión de las bacterias probióticas a los tejidos blandos es otro aspecto que promueve su efecto sobre la salud del huésped. Se ha demostrado que las bacterias probióticas pueden estimular la inmunidad local y modular la respuesta inflamatoria. La acción de los probióticos en la cavidad oral también se puede dividir en acción directa e indirecta.⁴³ El mecanismo directo

incluye la unión de los probióticos a la biopelícula a través de la unión a proteínas. Compete con las bacterias patógenas por la adherencia a la placa y al sustrato, y secreta químicos para inhibir la unión de otras bacterias bucales y, de esta manera, mejora la salud humana. Los químicos secretados son antimicrobianos péptidos o proteínas llamadas bacteriocinas. Estos antimicrobianos atacan a otros patógenos presentes en el mismo entorno ecológico. El mecanismo indirecto implica modular la inmunidad sistémica, local y producir antioxidantes para prevenir y/o tratar enfermedades bucales, los probióticos pueden actuar mediante la modulación de los procesos inflamatorios del huésped, inhibe la formación de placa y disminuir los recuentos de microorganismos causantes de enfermedades. Debido a que los probióticos no colonizan, ni se adhieren permanentemente en la cavidad oral, es necesario cumplir con la administración continua.⁴⁴

Existe interés en el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas, capaces de combatir las infecciones oportunistas. Por ello, es importante como primer paso, tener en cuenta los diferentes métodos de laboratorio que se pueden utilizar para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro*. La prueba de difusión en disco de agar, es un método utilizado por muchos laboratorios de microbiología para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de rutina. Se siembra un inóculo del microorganismo de prueba estándar en la placa de agar. A continuación, se coloca sobre la superficie del agar un disco de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro), que comprende la concentración deseada del compuesto de ensayo. Los microorganismos investigados se incuban en las placas Petri en condiciones adecuadas. El agente antimicrobiano se difunde en el agar, deteniendo el crecimiento y la germinación del microorganismo de prueba y luego se mide el diámetro del área de inhibición del crecimiento.⁴⁵

El método de difusión de pozos de agar es una variante del método anterior, utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas o microbianos. La superficie de la placa de agar se inocula extendiendo una cierta cantidad de inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar. Luego, se usa un taladro de corcho estéril o una punta para perforar un orificio con un diámetro de 6 a 8 mm en condiciones asépticas e introducir de 20 a 100 μL del agente antimicrobiano o extracto de la concentración deseada en el orificio. Luego, la

placa de agar se incubaba en condiciones controladas de acuerdo con los microorganismos de prueba. El agente antimicrobiano se dispersa en el agar e inhibe el desarrollo de la cepa de microorganismos probada. Otro método es el de microdilución en caldo, utilizado para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana más básica. El procedimiento implica el uso de una placa de microtitulación de 96 pocillos para preparar una dilución del agente antimicrobiano en un medio de crecimiento líquido dispensado en un tubo de ensayo de pequeño volumen. Después de diluir la suspensión microbiana estándar ajustada a una escala de 0,5 McFarland, se transfiere a cada pocillo una cierta cantidad de inóculo preparado en el mismo medio. Después de mezclar bien la microplaca de 96 pocillos se incuban en condiciones propias del microorganismo de interés.⁴⁶

III. MÉTODOLÓGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

Tipo de investigación: Básica.

Diseño de investigación: Experimental puro.

3.2. Variables y operacionalización

Las variables presentes en esta investigación son de tipo cuantitativas.

Variable independiente (VI): Cepas probióticas; *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527, *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus Casei* ATCC 393.

Variable dependiente (VD): Efecto in vitro contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

3.3. Población (criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis

La población estuvo compuesta por cuatro cepas probióticas: *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527, *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus Casei* ATCC 393.

La muestra estuvo conformada por una cantidad de microorganismos (inóculo) de cada una de las cepas probióticas (*Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527, *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus Casei* ATCC 393, además del inóculo de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277).

En esta investigación se aplicó el cálculo de repeticiones, donde a medida que estas aumentan tienen un mayor grado de precisión para llegar a determinar las unidades de ensayo. (Anexo 3)

La unidad de análisis estuvo constituida por una placa petri sembrada con la bacteria de interés y enfrentada a los probióticos evaluados.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica fue la experimentación. Se utilizó el método turbidimétrico para la obtención del inóculo estandarizado mediante el espectrofotómetro Kyntel VIS-KV-1200.^{47,48} La sensibilidad antimicrobiana in vitro se evaluó mediante el método de difusión en disco. Se utilizó un vernier calibrador para la medición de los halos de inhibición en los métodos de difusión en disco.⁴⁵ Este equipo no requirió calibración. Debido a que el procesamiento fue netamente microbiológico, realizado por un experto Microbiólogo (asesor) por lo que la calibración de las investigadoras no fue necesaria. (Anexo 5)

3.5. Procedimientos

Adquisición de cepas probióticas y de cepa problema

Las cepas microbiológicas utilizadas en la investigación fueron cepas estándar y adquiridas de la empresa GenLab del Perú S.A.C. Lima, Perú (12°05'22.6"S 77°02'27.4"W). Estas fueron: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527, *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus Casei* ATCC 393.

Medios de cultivo y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron el caldo Nutritivo para la reactivación de las cepas probióticas y de *Porphyromonas gingivalis*. Una vez reactivada la cepa de *P. gingivalis* se conservó viable en agar Sangre y en condiciones de anaerobiosis mediante un sistema Gaspak. Las cepas probióticas se preservaron en agar Tripticasa Soya en condiciones de microaerofilia. Todos los medios de cultivo son de la marca Merck, con certificación de calidad ISO 11133.⁴⁹

Reactivación de cepas probióticas y de *Porphyromonas gingivalis*

Los cultivos de probióticos y *P. gingivalis* se obtuvieron liofilizados y fueron reactivados en caldos de cultivo. Las cepas de interés fueron reactivadas en condiciones de esterilidad en los medios de cultivo descritos anteriormente. Las condiciones de cultivo fueron: Incubación a 37°C durante 24 – 48 h en

condición de anaerobiosis en el caso de *P. gingivalis* y en microaerofilia para el caso de las cepas probióticas.¹⁹

Preparación del inóculo microbiano

El inóculo microbiano perteneciente a todas las cepas microbiológicas fue determinado con un espectrofotómetro Kyntel VIS-KV-1200. Para las cepas probióticas, la concentración estándar del inóculo fue $1,5 \times 10^8$ y $1,5 \times 10^9$ UFC/mL y para *P. gingivalis* fue de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. La densidad óptica y la longitud de onda utilizada fue de 0,296 y 600 nm para las cepas probióticas y de 0,09 a 625 nm para *P. gingivalis*. La concentración de la suspensión se confirmó mediante recuento de UFC/mL en medio de cultivo sólido.⁵⁰

Preparación de Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo utilizados fueron preparados cumpliendo las especificaciones del fabricante (MERCK). Al ser medios de cultivos sólidos granulados fueron hidratados con agua destilada. Se llevó a calentamiento hasta la dilución completa de los medios de cultivo y luego se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 Lb de presión durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta los 45-50 °C y se sirvió en placas petri de vidrios esterilizados en estufa. Una vez servidos y solidificados los medios de cultivo se conservaron en refrigeración hasta su utilización.⁵¹

Prueba de susceptibilidad de *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 se cultivó en agar sangre a 37°C durante 24 – 48 h en anaerobiosis obtenida mediante sistema Gaspak. Se utilizó el método de difusión en disco, método recomendado por Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) para evaluar el efecto inhibitorio según su guía M100. Para este método las placas servidas con los medios de cultivo previamente fueron inoculadas mediante dispersión en superficie con un hisopo a partir del inóculo de *P. gingivalis*. Las placas sembradas se secaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de colocar los discos de susceptibilidad embebidos con los probióticos en la superficie. Los discos fueron de papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro y 1mm de espesor. Después de este proceso las placas se incubaron a 37°C durante

24-48 h en sistema de anaerobiosis Gaspak. Después del tiempo de incubación se procedió a realizar las lecturas de los halos de inhibición formados los cuales fueron expresados en milímetros y registrados en la ficha de recolección de datos. Los ensayos se realizaron por decuplicado. Se siguió el mismo procedimiento con el método de difusión en pozo.⁵² (Anexo 5)

3.6. Método de análisis de datos

Los resultados fueron registrados en la ficha de recolección de datos. Luego fueron digitalizados en el programa Excel. El análisis estadístico se realizó en el paquete estadístico SPSS v.26. Para determinar la normalidad de los datos se ejecutó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Al ser los datos normales se realizó el análisis paramétrico con ANOVA unidireccional. La comparación de las medias de los resultados y su significación estadística se determinó mediante análisis post hoc de Tukey. El nivel de confianza fue del 95% y los valores $P \leq 0,05$ se consideraron significativos.

3.7. Aspectos éticos

A nivel de investigación experimental, los aspectos éticos incluyeron el uso responsable y seguro de microorganismos. En este sentido, se siguieron todos los procedimientos de bioseguridad establecidos en los manuales de operatividad, gestión de residuos biocontaminados, de riesgos del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad César Vallejo, sede Trujillo. También se cumplió con los manuales de manejo de residuos de contaminación biológica y peligrosa de los laboratorios, del Ministerio de Salud (MINSA) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS).^{53, 54}

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Comparación del efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

SUSTANCIA	Concentración UFC/mL	Diámetro de halo de inhibición en mm Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	1,5 x10 ⁸	6,87				
<i>L. casei</i> ATCC 393			7,60			
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	1,5 x10 ⁹		7,61			
<i>L. casei</i> ATCC 393				8,51		
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	1,5 x10 ⁸			8,55		
<i>L. lactis</i> ATCC 11454				8,72		
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	1,5 x10 ⁹				9,40	
<i>L. lactis</i> ATCC 11454					9,85	
Clorhexidina	0,12%					15,25
Sig.		1,000	1,000	0,860	0,051	1,000

* Sig.= p= Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

La tabla 1 muestra los subconjuntos formados después del análisis y comparación de los promedios de halos de inhibición mediante la prueba de Tukey. Se entiende que un subconjunto es la agrupación de medias de inhibición estadísticamente iguales ($p > 0,05$). Se evaluaron 2 concentraciones de 4 probióticos más un control lo que hace teóricamente un total de 9 subconjuntos de ensayo, pero se observan solo 5 subconjuntos lo que significa que hay efectos inhibitorios que la estadística los está considerando iguales. Se identifica que en subconjunto 1 lo conforma solamente la concentración 1,5x10⁸ UFC/mL de *L. acidophilus* ATCC 4356 con un halo de inhibición de 6,87 mm. En subconjunto 2 se agrupa el efecto de la concentración 1,5 x10⁸ UFC/mL de *L. casei* ATCC 393 y el efecto de la concentración 1,5 x10⁹ UFC/mL de *L. acidophilus* ATCC. En el subconjunto 3, se considera como iguales efectos inhibitorios los producidos por la concentración 1,5 x10⁹ UFC/mL de *L. casei* ATCC 393 y la concentración 1,5 x10⁸ UFC/mL de *B. animalis* ATCC 25527 y *L. lactis* ATCC 11454 ($p=0,860$). El subconjunto 4 lo conforma la concentración 1,5 x10⁹ de *B. animalis* ATCC 25527 y *L. lactis* ATCC 11454. Finalmente, el subconjunto 5 corresponde al efecto del control positivo.

Tabla 2. Efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Sustancia	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	<i>p</i> **
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	1,5 x10 ⁸ UFC/mL	8,72	0,220	Bacteriostático	0,000
	1,5 x10 ⁹ UFC/mL	9,85	0,217	Bacteriostático	
Clorhexidina	0,12%	15,25	0,474	Bactericida	0,000

*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

** *p*= Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 2 se observa el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 y el control positivo clorhexidina 0,12% contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. La concentración de 1,5 x10⁸ UFC/mL del probiótico formó un halo de inhibición promedio de 8,72 ± 0,220 mm y la concentración de 1,5 x10⁹ UFC/mL un halo promedio de 9,85 ± 0,217 mm. Ambas inhibiciones son equivalentes a efecto antibacteriano de tipo bacteriostático. El control positivo, clorhexidina 0,12% formó un halo de 15,25 ± 0,474 mm equivalente a efecto antibacteriano de tipo bactericida. Se observa diferencia estadística altamente significativa entre las dos concentraciones del probiótico y también respecto al control (*p*<0,05).

Tabla 3. Efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Sustancia	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	<i>p</i> **
<i>Bifidobacterium animalis</i> ATCC 25527	1,5 x10 ⁸ UFC/mL	8,55	0,158	Bacteriostático	0,000
	1,5 x10 ⁹ UFC/mL	9,40	0,188	Bacteriostático	
Clorhexidina	0,12%	15,25	0,474	Bactericida	0,000

*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

** *p*= Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 3 se observa el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 y el control positivo clorhexidina 0,12% contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. La concentración de 1,5 x10⁸ UFC/mL del probiótico formó un halo de inhibición promedio de 8,55 ± 0,158 mm y la concentración de 1,5 x10⁹ UFC/mL un halo promedio de 9,40 ± 0,188 mm. Ambas inhibiciones son equivalentes a efecto antibacteriano de tipo bacteriostático. El control positivo, clorhexidina 0,12% formo un halo de 15,25 ± 0,474 mm equivalente a efecto antibacteriano de tipo bactericida. Se observa diferencia estadística altamente significativa entre las dos concentraciones del probiótico y también respecto al control (*p*<0,05).

Tabla 4. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Sustancia	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	p**
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	1,5 x10 ⁸ UFC/mL	6,87	0,529	Bacteriostático	0,000
	1,5 x10 ⁹ UFC/mL	7,61	0,284	Bacteriostático	
Clorhexidina	0,12%	15,25	0,474	Bactericida	0,000

*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

** p= Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 4 se observa el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y el control positivo clorhexidina 0,12% contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. La concentración de 1,5 x10⁸ UFC/mL del probiótico formó un halo de inhibición promedio de 6,87 ± 0,529 mm y la concentración de 1,5 x10⁹ un halo promedio de 7,61 ± 0,284 UFC/mL mm. Ambas inhibiciones son equivalentes a efecto antibacteriano de tipo bacteriostático. El control positivo, clorhexidina 0,12% formo un halo de 15,25 ± 0,474 mm equivalente a efecto antibacteriano de tipo bactericida. Se observa diferencia estadística altamente significativa entre las dos concentraciones del probiótico y también respecto al control (p<0,05).

Tabla 5. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Sustancia	Concentración UFC/mL	Zona de inhibición (mm)				<i>p</i> **
		Media	D.E*	Efecto		
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	1,5 x10 ⁸	7,60	0,278	Bacteriostático	0,000	
	1,5 x10 ⁹	8,51	0,284	Bacteriostático		
Clorhexidina	0,12%	15,25	0,474	Bactericida	0,000	

*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

** *p*= Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 5 se observa el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 393 y el control positivo clorhexidina 0,12% contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. La concentración de 1,5 x10⁸ UFC/mL del probiótico formó un halo de inhibición promedio de 7,60 ± 0,278 mm y la concentración de 1,5 x10⁹ UFC/mL un halo promedio de 8,51 ± 0,284 mm. Ambas inhibiciones son equivalentes a efecto antibacteriano de tipo bacteriostático. El control positivo, clorhexidina 0,12% formo un halo de 15,25 ± 0,474 mm equivalente a efecto antibacteriano de tipo bactericida. Se observa diferencia estadística altamente significativa entre las dos concentraciones del probiótico y también respecto al control (*p*<0,05).

V. DISCUSIÓN

Porphyromonas gingivalis es la bacteria patógena anaerobia gramnegativa considerada clave en la periodontitis. Sus factores de virulencia y patogenicidad favorecen su crecimiento y mejoran su supervivencia.³⁰ El tratamiento periodontal convencional a menudo no es suficiente por sí solo para controlar la inflamación destructiva de la periodontitis. Por ello se requiere de estrategias terapéuticas novedosas y eficaces que sean complementarias al tratamiento clínico periodontal. La utilización de los probióticos es uno de los enfoques que se vienen investigando para el tratamiento de la periodontitis por ser un complemento importante del tratamiento con antibióticos, tener administración sencilla, económica y segura.²⁵ Diversas investigaciones afirman que los probióticos pueden inhibir el desarrollo de *P. gingivalis* mediante el fenómeno de coagregación, adhesión competitiva y expresión de receptores tipo toll (TLR), además de reproducción de sustancias antagonistas ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, diacetilo, H₂O₂ y bacteriocinas.⁵⁵

En ese sentido, la presente investigación comparó el efecto inhibitorio de dos concentraciones de los probióticos *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 mediante el método de difusión en disco. Las concentraciones evaluadas fueron 1,5 x10⁸ UFC/mL y 1,5 x10⁹ UFC/mL. Los halos de inhibición formado por los probióticos fueron menores a los 12 mm y no superaron el efecto del control positivo que formó halos de inhibición superiores a 15 mm. Por tanto, esta inhibición permite afirmar que el efecto antibacteriano de los probióticos evaluados fue de tipo bacteriostático mientras que el efecto reportado por el control positivo fue de tipo bactericida.

Al respecto, Santos et al¹⁸ evaluaron la efectividad antimicrobiana de *L. reuteri* contra bacterias periodontopatógenas reportando que todas las preparaciones probióticas disminuyeron las UFC de *F. nucleatum*. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en la presente investigación

pues también se observó inhibición del crecimiento de *P. gingivalis* cuando se enfrentó a cada uno de los probióticos. Si bien, el tipo de inhibición del crecimiento de los periodontopatógenos no se puede precisar con certeza, podemos decir que lo más probable es que se haya debido a un antagonismo químico, principalmente debido a la producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico, ácido acético, diacetilo, H₂O₂ y bacteriocinas. Como sabemos, los periodontopatógenos no son acidofílicos, en consecuencia, una variación y disminución del pH del medio afectaría el desarrollo de estas bacterias y esto es lo que parece haber ocurrido.

Por su parte, Invercini et al¹⁹ evaluaron el efecto del probiótico *Bifidobacterium animalis* como adyuvante del raspado y alisado radicular en pacientes con periodontitis crónica generalizada. Observaron una disminución pronunciada sobre el recuento de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *C. showae* y *E. nodatum* para bolsas periodontales. Establecieron que la utilización de *B. lactis* HN019 como complemento del raspado y alisado radicular fomenta beneficios clínicos, microbiológicos e inmunológicos en el tratamiento de la periodontitis crónica. Del mismo modo, Chen et al¹⁵ investigaron experimentalmente la actividad antibacteriana de diversos probióticos y paraprobióticos contra patógenos orales. Demostraron que los probióticos *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* y *Bifidobacterium animalis* presentan alta actividad inhibitoria contra los principales microorganismos orales. Ellos fundamentaron que probablemente la producción de peróxido de hidrógeno pudo ser el responsable de la capacidad inhibitoria de los probióticos vivos. Este mismo fenómeno pudo haber ocurrido durante la evaluación en la presente investigación, pues la producción de sustancias antagonistas como ácido láctico, bacteriocinas o H₂O₂ es una característica intrínseca de las diferentes especies de lactobacillus como lo reporta Tomás et al.⁵⁶

En ese sentido, Routh et al²¹ determinaron la acción de los probióticos sobre *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia*. Reportaron acción antimicrobiana significativa de los probióticos sobre *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Estos resultados reafirman los obtenidos en la presente investigación. Del mismo modo Fernández et al²² evaluaron los efectos beneficiosos in vitro de *Streptococcus dentisani* como probiótico oral para enfermedades periodontales. Reportaron una fuerte acción inhibitoria de *S. dentisani* contra los patógenos periodontales en cultivo puro mediante mecanismos de competencia, adherencia y desplazamiento. Similares resultados fueron obtenidos por Widyarman et al²³ quienes evaluaron los efectos in vitro de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei* sobre la formación de biopelículas de los principales patógenos orales, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. reportaron una reducción significativa en las biopelículas de *S. mutans* y *P. gingivalis* después del tratamiento con los probióticos *L. reuteri* y *L. casei*. Como se puede observar, diversas investigaciones dan cuenta del potencial inhibitorio de diversos probióticos contra *P. gingivalis* en forma libre como cuando se encuentra conformando biofilm. Esto gracias a que la capacidad de los probióticos de producir diversos compuestos que actúan dentro de los patógenos como es el caso de las bacteriocinas, cuyo comportamiento es similar al de los antibióticos afectando membrana y pared celular imposibilitando así el crecimiento de las bacterias patógenas y fuera de ellos como los diversos ácidos que disminuyen el pH del medio afectando no selectivamente a los patógenos periodontales principalmente.

Al respecto, Cornacchione et al²⁴ evaluaron el efecto inhibitorio de *Lactobacillus delbrueckii* contra *P. gingivalis*. Demostraron que el piruvato oxidasa purificada y catalíticamente activa puede inhibir el crecimiento de *P. gingivalis* y pudieron concluir que las cepas *L. delbrueckii* son eficaces en la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal asociada a *P. gingivalis*. Por su parte, Elavarasu et al²⁵ evaluaron la eficacia de los probióticos BIFILAC contra *Porphyromonas gingivalis*. Reportaron que el probiótico BIFILAC tiene efecto antimicrobiano contra *P. gingivalis*. Estos resultados avalan los obtenidos en la presente investigación donde se logró establecer que los probióticos *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* presentan en mayor o menor

medida la capacidad de inhibir el desarrollo de *Porphyromonas gingivalis* en condiciones in vitro.

También se pudo deducir que la inhibición, que si bien, no logró superar a la de la clorhexidina genera confianza en la posibilidad de que pueda ser utilizado para regular la microbiota asociada a la enfermedad periodontal y de esta manera recurramos en menor medida a compuestos que generen resistencia microbiana o a procedimientos más agresivos para el paciente. De igual manera, esta posibilidad se hace más real considerando que la forma en que los probióticos regulan a los patógenos no es una vía única, sino que es múltiple e inespecífica por ellos que no solo afectaría a los patógenos de forma independiente sino también cuando se encuentran asociados a biofilm periodontal.

VI. CONCLUSIONES

1. La comparación indica que la concentración $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *L. casei* ATCC 393 y la concentración $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de *L. acidophilus* ATCC 4356 presentan el mismo efecto inhibitorio *in vitro* sobre *P. gingivalis* ATCC 33277. Al igual que el de la concentración $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de *L. casei* ATCC 393 y la concentración $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *B. animalis* ATCC 25527 y de *L. lactis* ATCC 11454 son estadísticamente iguales. Tal como la concentración $1,5 \times 10^9$ de *B. animalis* ATCC 25527 con la de *L. lactis* ATCC 11454.
2. El efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 es de tipo bacteriostático.
3. El efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 es de tipo bacteriostático.
4. El efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 es de tipo bacteriostático.
5. El efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 es de tipo bacteriostático.

VII. RECOMENDACIONES

1. Determinar el efecto inhibitorio de los probióticos nativos sobre biofilm conformado por bacterias periodontopatógenas en modelos de boca artificial.
2. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis* contra *Porphyromonas gingivalis* para convertirlo en efecto bactericida.
3. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527 contra *Porphyromonas gingivalis* para convertirlo en efecto bactericida.
4. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Porphyromonas gingivalis* para convertirlo en efecto bactericida.
5. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Porphyromonas gingivalis* para convertirlo en efecto bactericida.

REFERENCIAS

1. Hurtado C, Bojórquez A, Montaña P, López M. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. Oral [Internet]. 2016 [citado 6 Set 2020]; 17(54):1374-8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=72938>
2. Cruz SM, Díaz P, Mazón GM, Arias D. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2017 [citado 6 Set 2020]; 54(1): 47-52. Disponible en: <http://www.revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/1323>
3. Gutiérrez R, Lunini P, Goyoneche P. Lactobacillus reuteri como coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad gingival y periodontal. Revisión sistemática de la literatura. Rev Venez Invest Odont IADR [Internet]. 2020 [Citado 5 set 2020]; 8(1):105-21. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/rvio/article/view/15634>
4. Vives A, Chimenos E. Effect of probiotics as a complement to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis: a systematic review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal [Internet]. 2020 [Citado 5 Set 2020]; 25(2):161-7. Disponible en: Doi: 10.4317 / medoral.23147
5. Mejías L, Iriarte D, Sánchez R, Neira I, Bravo J. Comparison of Total Anaerobic Microbiota in Periodontitis Before and After the Subgingival Irrigation with Chlorhexidine at 0.12 %. Int J Odontostomat [Internet]. 2019 [citado 6 Set 2020]; 13(4):442-5. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2019000400442&lng=es.
6. Morales AI, Galaz C, González J, Silva N, Hernández M, Godoy C et al. Efecto clínico del uso de probiótico en el tratamiento de la periodontitis crónica: ensayo clínico. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral [Internet]. 2016 [citado 5 Set 2020]; 9(2):146-52. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072016000200011&lng=es.
7. Pardo F, Hernández L. Enfermedad periodontal: enfoques epidemiológicos para su análisis como problema de salud pública. Rev salud pública [Internet]. 2018 [citado 06 Set 2020]; 20(2): 258-64. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642018000200258&lng=es

8. Bui F, Almeida-da-Silva C, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J* [Internet]. 2019 [citado 6 Set 2020]; 42(1): 27–35. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>
9. Gutiérrez R, Salas E. Cepas de bacterias probióticas como terapia coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal. Revisión de la literatura. *Rev Odont de Los Andes* [Internet]. 2018 [citado 5 Set 2020]; 13(1):62-78. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/44578>
10. Jayaram P, Chatterjee A, Raghunathan V. Probiotics in the treatment of periodontal disease: A systematic review. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2016 [citado 5 Set 2020]; 20(5):488-95. Disponible en: Doi:10.4103/0972-124X.207053
11. Seminario M, López J, Estrugo A, Ayuso R, Jané E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. 2017 [citado 5 Set 2020]; 22(3):282-8. Disponible en: Doi:10.4317/medoral.21494
12. Laleman I, Teughels W. Probiotics in the dental practice: a review. *Quintessence Int* [Internet]. 2015 [citado 5 Set 2020]; 46(3):255-64. Disponible en: Doi:10.3290/j.qi.a33182
13. Invernici MM, Salvador SL, Silva PH, Soares MS, Casarin R, Palioto DB et al. Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2018 [citado 5 Set 2020]; 45(10):1198-210. Disponible en: Doi:10.1111/jcpe.12995
14. Prathoshni M, Rajasekar A. Significance of probiotics in periodontal therapy: A short review. *Dit* [Internet]. 2019 [citado 5 Set 2020]; 11(8):1807-10. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=139149350&lang=es&site=eds-live>
15. Pujia AM, Costacurta M, Fortunato L, Merra G, Cascapera S, Calvani M et al. The probiotics in dentistry: a narrative review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2017 [citado 5 Set 2020]; 21(6):1405-12. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28387884/>

16. Allaker RP, Stephen AS. Use of Probiotics and Oral Health. *Curr Oral Health Rep* [Internet]. 2017 [citado 5 Set 2020]; 4(4):309–18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5688201/#:~:text=Current%20probiotics%20also%20show%20limited,and%20maintain%20oral%20health%20benefits>.
17. Ramos D, Berrocal C, Cuentas A, Castro A. Probióticos como posible apoyo en el tratamiento de la periodontitis crónica. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* [Internet]. 2018 [citado 5 Set 2020]; 11(2):112-5. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072018000200112&lng=es.
18. Santos TA, Scorzoni L, Correia R, Junqueira JC, Anbinder AL. Interaction between *Lactobacillus reuteri* and periodontopathogenic bacteria using in vitro and in vivo (*G. mellonella*) approaches. *Pathog Dis* [Internet]. 2020 [Citado 11 Nov 2020]; 78(8):1-26. Disponible en: Doi:10.1093/femspd/ftaa044.
19. Invernici M, Furlaneto F, Salvador S, Ouwehand A, Salminen S, Mantziari A, et al. *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *Plos One* [Internet]. 2020 [Citado 11 Nov 2020]; 15(9):1-20. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238425>
20. Chen Y, Hsieh P, Ho S, Hsieh S, Kuo Y, Yang S et al. Antibacterial activity of viable and heat-killed probiotic strains against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol One* [Internet]. 2020 [Citado 11 Nov 2020]; 70(1):310-20. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lam.13275>
21. Routh S, Pai M, Rajesh G, Shenoy R, Sarit S. Effect of Probiotics on Dental Caries and Periodontal Pathogens: An In Vitro Study. *J Orofac Sci* [Internet]. 2019 [citado 10 Set 2020]; 11(1):49-54. Disponible en: https://doi.org/10.4103/jofs.jofs_41_19
22. Fernández A, Ferrer M, Zorraquín I, López A, Moreno M, Mira A. In vitro beneficial effects of *Streptococcus dentisani* as potential oral probiotic for periodontal diseases. *J Periodontol* [Internet]. 2019 [citado 10 Set 2020]; 90(11):1346-55. Disponible en: Doi:10.1002/JPER.18-0751
23. Widyarman A, Bachtiar E, Bachtiar B, Seneviratne C. Inhibitory effect of probiotic lactobacilli against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas*

- gingivalis biofilms. *Sci Dent J* [Internet]. 2019 [citado 11 Set 2020]; 3(2):50-5. Disponible en: Doi:10.4103/SDJ.SDJ_8_19.
24. Cornacchione L, Klein B, Duncan M, Hu L. Interspecies Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* by Yogurt-Derived *Lactobacillus delbrueckii* Requires Active Pyruvate Oxidase. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2019 [citado 10 Set 2020]; 85(18):1271-319. Disponible en: Doi:10.1128/AEM.01271-19.
25. Elavarasu S, Suthanthiran T, Thangavelu A, Kanagaraj SS, Mohandas L, Sekar S. Evaluation of efficacy of probiotic (BIFILAC) on *Porphyromonas gingivalis*: In vitro study. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2016 [citado 10 Set 2020]; 8(1):45-7. Disponible en: Doi:10.4103/0975-7406.191966
26. Bartold P, Van T. An appraisal of the role of specific bacteria in the initial pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2019 [citado 12 Set 2020]; 46(1):6-11. Disponible en: Doi:10.1111/jcpe.13046
27. Macín S, Sanz A, Castrillón R, Palma A, Noguez N, Quirino C et al. Non surgical periodontal treatment in patients with gingivitis and moderate periodontitis. Biochemical and microbiological response. *Rev Odont Mex* [Internet]. 2015 [citado 12 Set 2020]; 19(3):155-64. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=58795>
28. Asok A, Bhandary R, Shetty M, Shenoy N. Probiotics and periodontal disease. *Int J Oral Health Sci* [Internet]. 2018 [citado 12 Set 2020]; 8(2):68-72. Disponible en: Doi: 10.4103/ijohs.ijohs_10_18.
29. Kobayashi R, Kobayashi T, Sakai F, Hosoya T, Yamamoto M, Kurita T. La administración oral de *Lactobacillus gasseri* SBT2055 es eficaz para prevenir la enfermedad periodontal acelerada por *Porphyromonas gingivalis*. *Sci Rep* [Internet]. 2017 [citado 13 Set 2020]; 7(1):1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00623-9>
30. Mendi A, Köse S, Uçkan D, Akca G, Yilmaz D, Aral L et al. *Lactobacillus rhamnosus* could inhibit *Porphyromonas gingivalis* derived CXCL8 attenuation. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2016 [citado 13 Set 2020]; 24(1):67-75. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1678-775720150145>
31. Orrego M, Parra M, Salgado Y, Muñoz E, Fandiño V. *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *CES odontol* [Internet]. 2015 [citado 13 Set 2020];

28(1):57-73.

Disponible

en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2015000100006&lng=en.

32. Moreno S, Jaramillo A, Parra B, Botero J, Contreras A. Porphyromonas gingivalis Fim-A genotype distribution among Colombians. Colomb Med [Internet]. 2015 [citado 13 Set 2020]; 46(3):122-7. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342015000300006&lng=en.
33. Manresa C, Sanz E, Twigg J, Bravo M. Supportive periodontal therapy (SPT) for maintaining the dentition in adults treated for periodontitis. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 2018 [citado 13 Set 2020]; 1(1):1-50. Disponible en: Doi:10.1002/14651858.CD009376.pub2
34. Ardila C, Solarte A, Guzmán I. Porphyromonas gingivalis influye en la eficacia de la terapia periodontal. AMC [Internet]. 2016 [citado 13 Set 2020]; 20(4):425-31. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552016000400011&lng=es.
35. O'Rourke V. Azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy: a systematic review. Aust Dent J [Internet]. 2017 [citado 13 Set 2020]; 62(1):14-22. Disponible en: Doi:10.1111/adj.12448
36. Poorni S, Srinivasan M, Nivedhitha M. Probiotic *Streptococcus* strains in caries prevention: A systematic review. J Conserv Dent [Internet]. 2019 [citado 13 Set 2020]; 22(2):123-8. Disponible en: Doi:10.4103/JCD.JCD_505_18
37. Fierro C, Aguayo C, Lillo F, Riveros F. Rol de los Probióticos como bacterioterapia en Odontología. Revisión de la literatura. Odontoestomatol [Internet]. 2017 [citado 13 Set 2020]; 19(30):4-13. Disponible en: Doi:10.22592/o2017n30a2
38. Nadelman P, Magno M, Masterson D, Da Cruz A, Maia L. ¿Are dairy products containing probiotics beneficial for oral health? A systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig [Internet]. 2018 [citada 13 Set 2020]; 22(8):2763-85. Disponible en: Doi: 10.1007 / s00784-018-2682-9
39. George V, Varghese M, Vaseem M, Thomas A, Ittycheria P, Sreejith C. The Promising Future of Probiotics: A New Era in Periodontal Therapy. J Int Oral Health [Internet]. 2016 [citado 13 Set 2020]; 8(3):404-8. Disponible en:

<https://www.jioh.org/article.asp?issn=0976-7428;year=2016;volume=8;issue=3;spage=404;epage=408;aulast=George;type=0>

40. Oliveira L, Salvador S, Silva P, Furlaneto F, Figueiredo L, Casarin R et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol* [Internet]. 2017 [citado 13 Set 2020]; 88(2):197-208. Disponible en: Doi:10.1902/jop.2016.160217.
41. Buchtik N, Lamas M. Probióticos en la prevención de caries. *Salud Mil* [Internet]. 2019 [citado 14 May 2021]; 38(2):73-82. Disponible en: https://www.dnsffaa.gub.uy/detalle-nota/revision-probioticos_revistadic2019
42. Angarita M. Probióticos y su relación con el control de caries. Revisión del tema. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* [Internet]. 2016 [citado 13 Set 2020]; 28(1):179-202. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v28n1a10>.
43. Alok A, Singh I, Singh S, Kishore M, Jha P, Iqbal M. Probiotics: A New Era of Biotherapy. *Adv Biomed Res* [Internet]. 2017 [citado 13 Set 2020]; 6(1):1-10. Disponible en: Doi:10.4103/2277-9175.192625
44. Masarwa N, Al-Nsour H, Al-Awabdeh H, Haddadin K. The Use of Probiotics in Prevention and Treatment of Oral Diseases. *EC Dental Science* [Internet]. 2018 [citado 13 Set 2020]; 17(10):1783-91. Disponible en: <https://www.econicon.com/ecde/pdf/ECDE-17-00811.pdf>
45. Vega A, Vázquez A, Acosta E, Álvarez M. In vitro Antimicrobial Activity Evaluation of Metal Oxide Nanoparticles. Chapter [Internet]. 2019 [citado 13 Set 2020]; 1(1):1-18. Disponible en: Doi:10.5772/intechopen.84369.
46. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda S. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* [Internet]. 2016 [citada 13 Set 2020]; 6(2):71-9. Disponible en Doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
47. Acebo D, Hernández A. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* [Internet]. 2013 [citado 20 Set 2020]; 44(1):1-18. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226886003>
48. García R. Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro. *Avances Quim* [Internet]. 2018 [citada 20 Set 2020]; 13(3):79-82. Disponible en:

- https://www.researchgate.net/publication/331047439_Instrumentos_que_revolucionaron_la_quimica_la_historia_del_espectrofotometro
49. Tiselab Soluciones GMP. Visión general de la nueva ISO 11133:2014 desde la perspectiva del control de calidad. LAB. [citada 12 Nov 2020]. 2014;1-4. Disponible en: <http://www.tiselab.com/comunicados/ISO-11133-2014-White-Paper.pdf>
 50. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Edición. CLSI. [citada 23 Oct 2020]. 2018;1-296. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/>
 51. Burguet N, Castillo L. Control de calidad de los medios de cultivo utilizados en el monitoreo ambiental de las áreas clasificadas de producción. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2013 [citada 12 Nov 2020]; 51(2):155-60. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000200004&lng=es.
 52. Mühlhauser M, Rivas L. Laboratorio De Microbiología: Conocimientos Básicos Para Un Clínico. Rev Med Clin Condes [Internet]. 2014 [Citado 12 Nov 2020]; 25(3):569-79. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864014700720>
 53. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Tercera Edición. OMS. [citada 23 Oct 2020]. 2005;1-223. Disponible en: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
 54. Ministerio de Salud Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos. Tercera Edición. Cepredim. [citada 23 Oct 2020]. 2005;1-109. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1669.pdf>
 55. Mishra C, Lambert J. Production of anti-microbial substances by probiotics. Asia Pac J Clin Nutr [Internet]. 1996 [Citado 20 Jun 2021]; 5(1):20-4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24394460/>
 56. Tomás MS, Claudia Otero M, Ocaña V, Elena Nader-Macías M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen

peroxide. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2004 [Citado 20 Jun 2021]; 268:337-346.
Disponible en: doi: 10.1385/1-59259-766-1:337.

ANEXOS

ANEXO 1

MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

variables de estudio	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicadores	Escala de medición
Probióticos	Son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped. ³⁸	Son bacterias grampositivas capaces de generar competencias contra los agentes patógenos cuando son enfrentados in vitro. Su concentración se medirá espectrofotométricamente.	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. shermanii ATCC 9614 <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. Lactis DSM 15954 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. lactis ATCC 11454	Concentración 1,5 x 10 ⁸ UFC/mL 1,5 x 10 ⁹ UFC/mL	De razón
Efecto contra <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Es un cocobacilo gramnegativo anaeróbico estricto que habita en el área subgingival. ^{31,32}	El efecto contra <i>P. gingivalis</i> , agente causal de enfermedad periodontal, se establecerá mediante la inhibición del crecimiento por la formación de halos de inhibición que serán expresados en mm.	Diámetro del halo de inhibición en mm	Halos de Inhibición 0 mm = Sin efecto < 12 mm = Efecto bacteriostáticos ≥ 14 mm = Efecto bactericida	De razón

ANEXO 3

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

$$n = \frac{w - w^2 \cdot Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha}^2}{w^2}$$

Dónde:

n: Número mínimo de repeticiones presentes en el estudio.

Z α : Valor designado al nivel de confianza.

Z β : Valor designado al valor estadístico.

W: La diferencia mínima observable.

Siendo, Z α = 1.96; Z β = 0.842 y W = 0.80 (80%). Si sustituimos los valores en la fórmula se obtiene como resultado 9; número de repeticiones necesarias.

$$n = \frac{0.80 - 0.80^2 \cdot 0.842 + 1,4 \cdot 1.96^2}{0.80^2}$$

$$n = \frac{0.80 - 0.64 \cdot 0.842 + 1,4 \cdot 3.8416}{0.64}$$

$$n = \frac{0.80 - 0.53888 + 5.37824}{0.64}$$

$$n = 9$$

ANEXO 4

TABLAS, FIGURAS Y FOTOS

Resumen de procesamiento de casos							
	Concentración de probiótico	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Diámetro de halo de inhibición <i>P. gingivalis</i>	L. acidophilus 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	L. acidophilus 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	L. casei 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	L. casei 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	L. lactis 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	L. lactis 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	B. animalis 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	B. animalis 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	Clorhexidina 0,12%	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%

Descriptivos					
	Concentración de probiótico		Estadístico	Error estándar	
Diámetro de halo de inhibición <i>P. gingivalis</i>	L. acidophilus 1	Media	6,8700	,16737	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	6,4914	
			Límite superior	7,2486	
		Media recortada al 5%	6,8500		
		Mediana	6,7500		
		Varianza	,280		
		Desviación estándar	,52926		
		Mínimo	6,30		
		Máximo	7,80		
		Rango	1,50		
		Rango intercuartil	,85		
		Asimetría	,952	,687	
		Curtosis	-,369	1,334	
		L. acidophilus 2	Media	7,6100	,09000
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	7,4064	
			Límite superior	7,8136	
	Media recortada al 5%		7,6111		
	Mediana		7,6000		
	Varianza		,081		
	Desviación estándar		,28460		
	Mínimo		7,20		
	Máximo		8,00		
	Rango		,80		
	Rango intercuartil		,42		
	Asimetría		-,090	,687	
	Curtosis		-,858	1,334	
	L. casei 1		Media	7,6000	,08819
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	7,4005	
			Límite superior	7,7995	
		Media recortada al 5%	7,6000		
		Mediana	7,5000		

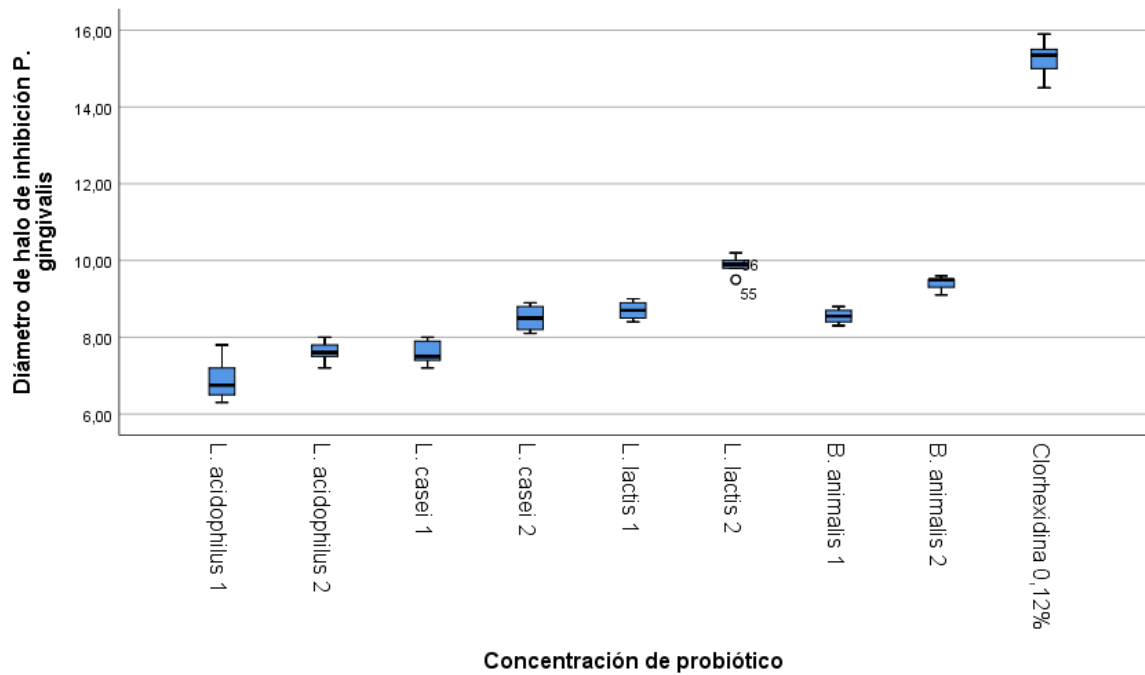
		Varianza		,078	
		Desviación estándar		,27889	
		Mínimo		7,20	
		Máximo		8,00	
		Rango		,80	
		Rango intercuartil		,53	
		Asimetría		,154	,687
		Curtosis		-1,489	1,334
	L. casei 2	Media		8,5100	,09000
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	8,3064	
			Límite superior	8,7136	
		Media recortada al 5%		8,5111	
		Mediana		8,5000	
		Varianza		,081	
		Desviación estándar		,28460	
		Mínimo		8,10	
		Máximo		8,90	
		Rango		,80	
		Rango intercuartil		,60	
		Asimetría		-,090	,687
		Curtosis		-1,497	1,334
	L. lactis 1	Media		8,7200	,06960
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	8,5625	
			Límite superior	8,8775	
		Media recortada al 5%		8,7222	
		Mediana		8,7000	
		Varianza		,048	
		Desviación estándar		,22010	
		Mínimo		8,40	
		Máximo		9,00	
		Rango		,60	
		Rango intercuartil		,43	
		Asimetría		-,003	,687
		Curtosis		-1,571	1,334
	L. lactis 2	Media		9,8500	,06872
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	9,6945	
			Límite superior	10,0055	
		Media recortada al 5%		9,8500	
		Mediana		9,9000	
		Varianza		,047	
		Desviación estándar		,21731	
		Mínimo		9,50	
		Máximo		10,20	
		Rango		,70	
		Rango intercuartil		,27	
		Asimetría		-,487	,687
		Curtosis		,169	1,334
	B. animalis 1	Media		8,5500	,05000
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	8,4369	
			Límite superior	8,6631	

		Media recortada al 5%	8,5500	
		Mediana	8,5500	
		Varianza	,025	
		Desviación estándar	,15811	
		Mínimo	8,30	
		Máximo	8,80	
		Rango	,50	
		Rango intercuartil	,30	
		Asimetría	,000	,687
		Curtosis	-,895	1,334
	B. animalis 2	Media	9,4000	,05963
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	9,2651
			Límite superior	9,5349
		Media recortada al 5%	9,4056	
		Mediana	9,5000	
		Varianza	,036	
		Desviación estándar	,18856	
		Mínimo	9,10	
		Máximo	9,60	
		Rango	,50	
		Rango intercuartil	,28	
		Asimetría	-,746	,687
		Curtosis	-,886	1,334
	Clorhexidina 0,12%	Media	15,2500	,15000
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	14,9107
			Límite superior	15,5893
		Media recortada al 5%	15,2556	
		Mediana	15,3500	
		Varianza	,225	
		Desviación estándar	,47434	
		Mínimo	14,50	
		Máximo	15,90	
		Rango	1,40	
		Rango intercuartil	,70	
		Asimetría	-,515	,687
		Curtosis	-,409	1,334

Pruebas de normalidad							
	Concentración de probiótico	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro de halo de inhibición <i>P. gingivalis</i>	L. acidophilus 1	,253	10	,070	,868	10	,094
	L. acidophilus 2	,150	10	,200 [*]	,920	10	,358
	L. casei 1	,240	10	,107	,915	10	,318
	L. casei 2	,162	10	,200 [*]	,926	10	,414
	L. lactis 1	,193	10	,200 [*]	,914	10	,310
	L. lactis 2	,209	10	,200 [*]	,908	10	,268
	B. animalis 1	,129	10	,200 [*]	,966	10	,849
	B. animalis 2	,302	10	,010	,841	10	,045
	Clorhexidina 0,12%	,158	10	,200 [*]	,922	10	,376

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors



Unidireccional

Descriptivos								
Diámetro de halo de inhibición P. gingivalis								
	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
L. acidophilus 1	10	6,8700	,52926	,16737	6,4914	7,2486	6,30	7,80
L. acidophilus 2	10	7,6100	,28460	,09000	7,4064	7,8136	7,20	8,00
L. casei 1	10	7,6000	,27889	,08819	7,4005	7,7995	7,20	8,00
L. casei 2	10	8,5100	,28460	,09000	8,3064	8,7136	8,10	8,90
L. lactis 1	10	8,7200	,22010	,06960	8,5625	8,8775	8,40	9,00
L. lactis 2	10	9,8500	,21731	,06872	9,6945	10,0055	9,50	10,20
B. animalis 1	10	8,5500	,15811	,05000	8,4369	8,6631	8,30	8,80
B. animalis 2	10	9,4000	,18856	,05963	9,2651	9,5349	9,10	9,60
Clorhexidina 0,12%	10	15,2500	,47434	,15000	14,9107	15,5893	14,50	15,90
Total	90	9,1511	2,35836	,24859	8,6572	9,6451	6,30	15,90

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Diámetro de halo de inhibición P. gingivalis	Se basa en la media	3,119	8	81	,004
	Se basa en la mediana	2,000	8	81	,057
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,000	8	42,619	,070
	Se basa en la media recortada	2,895	8	81	,007

ANOVA					
Diámetro de halo de inhibición P. gingivalis					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	486,895	8	60,862	607,868	,000
Dentro de grupos	8,110	81	,100		
Total	495,005	89			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición P. gingivalis							
	(I) Concentración de probiótico	(J) Concentración de probiótico	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	L. acidophilus 1	L. acidophilus 2	-,74000*	,14151	,000	-1,1910	-,2890
		L. casei 1	-,73000*	,14151	,000	-1,1810	-,2790
		L. casei 2	-1,64000*	,14151	,000	-2,0910	-1,1890
		L. lactis 1	-1,85000*	,14151	,000	-2,3010	-1,3990
		L. lactis 2	-2,98000*	,14151	,000	-3,4310	-2,5290
		B. animalis 1	-1,68000*	,14151	,000	-2,1310	-1,2290
		B. animalis 2	-2,53000*	,14151	,000	-2,9810	-2,0790
	Clorhexidina 0,12%	-8,38000*	,14151	,000	-8,8310	-7,9290	
	L. acidophilus 2	L. acidophilus 1	,74000*	,14151	,000	,2890	1,1910
		L. casei 1	,01000	,14151	1,000	-,4410	,4610
		L. casei 2	-,90000*	,14151	,000	-1,3510	-,4490
		L. lactis 1	-1,11000*	,14151	,000	-1,5610	-,6590
		L. lactis 2	-2,24000*	,14151	,000	-2,6910	-1,7890
		B. animalis 1	-,94000*	,14151	,000	-1,3910	-,4890
		B. animalis 2	-1,79000*	,14151	,000	-2,2410	-1,3390
	Clorhexidina 0,12%	-7,64000*	,14151	,000	-8,0910	-7,1890	
	L. casei 1	L. acidophilus 1	,73000*	,14151	,000	,2790	1,1810
		L. acidophilus 2	-,01000	,14151	1,000	-,4610	,4410
		L. casei 2	-,91000*	,14151	,000	-1,3610	-,4590
		L. lactis 1	-1,12000*	,14151	,000	-1,5710	-,6690
		L. lactis 2	-2,25000*	,14151	,000	-2,7010	-1,7990
		B. animalis 1	-,95000*	,14151	,000	-1,4010	-,4990
		B. animalis 2	-1,80000*	,14151	,000	-2,2510	-1,3490
	Clorhexidina 0,12%	-7,65000*	,14151	,000	-8,1010	-7,1990	
	L. casei 2	L. acidophilus 1	1,64000*	,14151	,000	1,1890	2,0910
		L. acidophilus 2	,90000*	,14151	,000	,4490	1,3510
		L. casei 1	,91000*	,14151	,000	,4590	1,3610
		L. lactis 1	-,21000	,14151	,860	-,6610	,2410
		L. lactis 2	-1,34000*	,14151	,000	-1,7910	-,8890
		B. animalis 1	-,04000	,14151	1,000	-,4910	,4110
		B. animalis 2	-,89000*	,14151	,000	-1,3410	-,4390
	Clorhexidina 0,12%	-6,74000*	,14151	,000	-7,1910	-6,2890	
	L. lactis 1	L. acidophilus 1	1,85000*	,14151	,000	1,3990	2,3010
		L. acidophilus 2	1,11000*	,14151	,000	,6590	1,5610
		L. casei 1	1,12000*	,14151	,000	,6690	1,5710
		L. casei 2	,21000	,14151	,860	-,2410	,6610
		L. lactis 2	-1,13000*	,14151	,000	-1,5810	-,6790
		B. animalis 1	,17000	,14151	,954	-,2810	,6210
		B. animalis 2	-,68000*	,14151	,000	-1,1310	-,2290
	Clorhexidina 0,12%	-6,53000*	,14151	,000	-6,9810	-6,0790	
	L. lactis 2	L. acidophilus 1	2,98000*	,14151	,000	2,5290	3,4310
		L. acidophilus 2	2,24000*	,14151	,000	1,7890	2,6910
		L. casei 1	2,25000*	,14151	,000	1,7990	2,7010
		L. casei 2	1,34000*	,14151	,000	,8890	1,7910
		L. lactis 1	1,13000*	,14151	,000	,6790	1,5810
		B. animalis 1	1,30000*	,14151	,000	,8490	1,7510
		B. animalis 2	,45000	,14151	,051	-,0010	,9010
	Clorhexidina 0,12%	-5,40000*	,14151	,000	-5,8510	-4,9490	
B. animalis 1	L. acidophilus 1	1,68000*	,14151	,000	1,2290	2,1310	
	L. acidophilus 2	,94000*	,14151	,000	,4890	1,3910	
	L. casei 1	,95000*	,14151	,000	,4990	1,4010	
	L. casei 2	,04000	,14151	1,000	-,4110	,4910	
	L. lactis 1	-,17000	,14151	,954	-,6210	,2810	
L. lactis 2	-1,30000*	,14151	,000	-1,7510	-,8490		

	B. animalis 2	B. animalis 2	-,85000*	,14151	,000	-1,3010	-,3990
		Clorhexidina 0,12%	-6,70000*	,14151	,000	-7,1510	-6,2490
		L. acidophilus 1	2,53000*	,14151	,000	2,0790	2,9810
		L. acidophilus 2	1,79000*	,14151	,000	1,3390	2,2410
		L. casei 1	1,80000*	,14151	,000	1,3490	2,2510
		L. casei 2	,89000*	,14151	,000	,4390	1,3410
		L. lactis 1	,68000*	,14151	,000	,2290	1,1310
		L. lactis 2	-,45000	,14151	,051	-,9010	,0010
		B. animalis 1	,85000*	,14151	,000	,3990	1,3010
	Clorhexidina 0,12%	Clorhexidina 0,12%	-5,85000*	,14151	,000	-6,3010	-5,3990
		L. acidophilus 1	8,38000*	,14151	,000	7,9290	8,8310
		L. acidophilus 2	7,64000*	,14151	,000	7,1890	8,0910
		L. casei 1	7,65000*	,14151	,000	7,1990	8,1010
		L. casei 2	6,74000*	,14151	,000	6,2890	7,1910
		L. lactis 1	6,53000*	,14151	,000	6,0790	6,9810
		L. lactis 2	5,40000*	,14151	,000	4,9490	5,8510
		B. animalis 1	6,70000*	,14151	,000	6,2490	7,1510
		B. animalis 2	5,85000*	,14151	,000	5,3990	6,3010

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

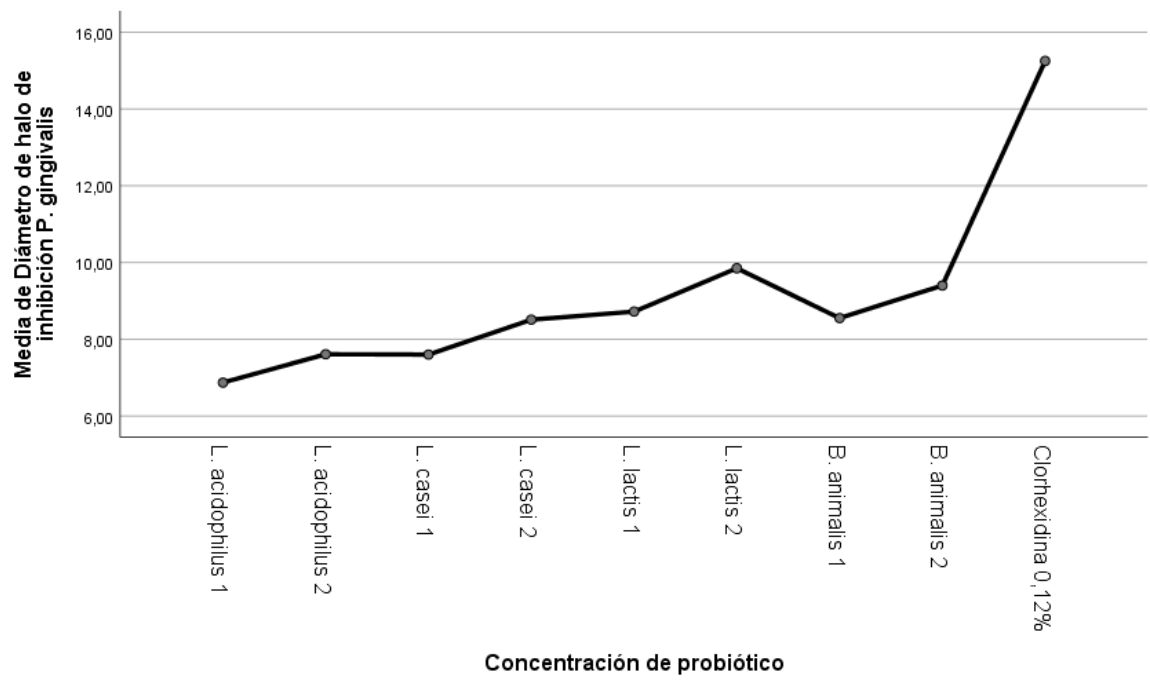
Subconjuntos homogéneos

Diámetro de halo de inhibición <i>P. gingivalis</i>								
	Concentración de probiótico	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
HSD Tukey ^a	L. acidophilus 1	10	6,8700					
	L. casei 1	10		7,6000				
	L. acidophilus 2	10		7,6100				
	L. casei 2	10			8,5100			
	B. animalis 1	10			8,5500			
	L. lactis 1	10			8,7200			
	B. animalis 2	10				9,4000		
	L. lactis 2	10				9,8500		
	Clorhexidina 0,12%	10					15,2500	
	Sig.			1,000	1,000	,860	,051	1,000
Duncan ^a	L. acidophilus 1	10	6,8700					
	L. casei 1	10		7,6000				
	L. acidophilus 2	10		7,6100				
	L. casei 2	10			8,5100			
	B. animalis 1	10			8,5500			
	L. lactis 1	10			8,7200			
	B. animalis 2	10				9,4000		
	L. lactis 2	10					9,8500	
	Clorhexidina 0,12%	10						15,2500
	Sig.			1,000	,944	,166	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Gráficos de medias



ANEXO 5

GALERÍA FOTOGRÁFICA

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

01

Método
Turbidimétrico



Espectrofotómetro
Marca: KynTel
Modelo: VIS-KV-1200

02

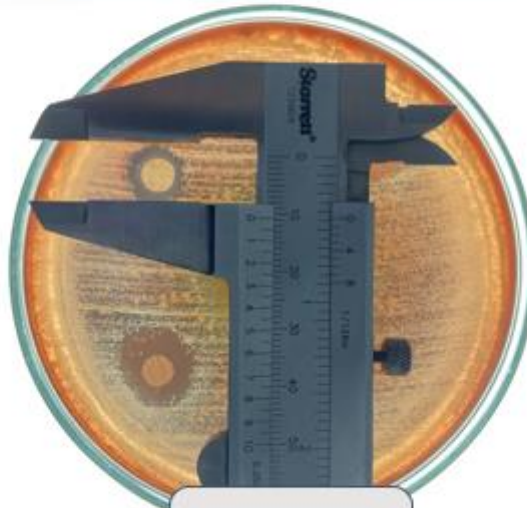
Métodos de Laboratorio



Método de difusión de
disco en agar

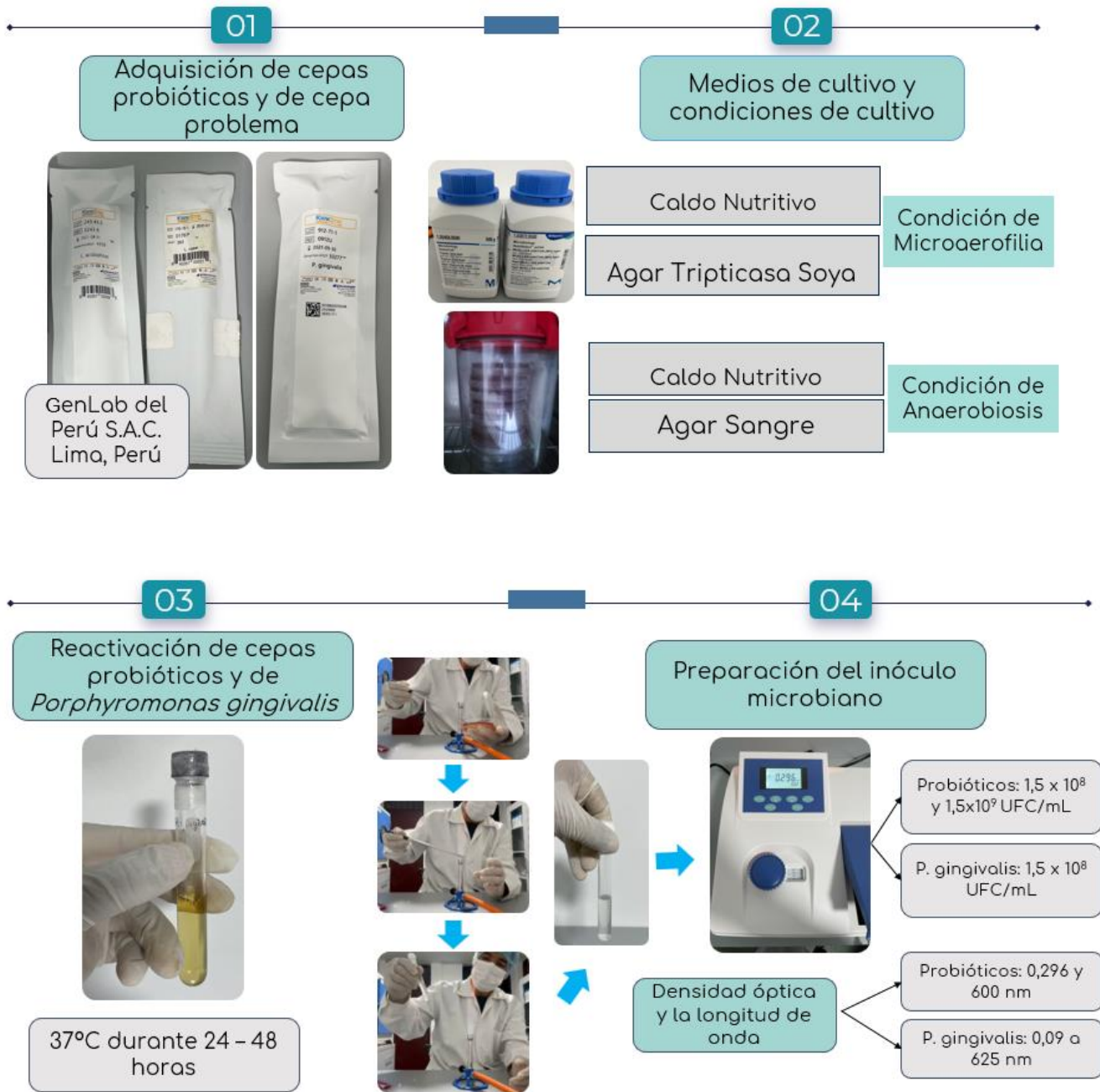
03

Vernier
Calibrador



Mecánico

PROCEDIMIENTOS:



05

Preparación de Medios de cultivo



121°C, 15 Lb de presión durante 15 minutos.

Enfriar hasta los 45-50°C

06

Prueba de susceptibilidad de *Porphyromonas gingivalis*





UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA**

Declaratoria de Autenticidad del Asesor

Yo, RUIZ BARRUETO MIGUEL ANGEL, docente de la FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD de la escuela profesional de ESTOMATOLOGÍA de la UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO SAC - PIURA, asesor de Tesis titulada: "EFECTO IN VITRO DE CEPAS PROBIÓTICAS CONTRA PORPHYROMONAS GINGIVALIS ATCC 33277", cuyos autores son RUJEL RAMOS ESTEFANY FERNANDA, RAMIREZ POZO TABATA SOFIA, constato que la investigación cumple con el índice de similitud establecido, y verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin, el cual ha sido realizado sin filtros, ni exclusiones.

He revisado dicho reporte y concluyo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la Tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

En tal sentido, asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

PIURA, 21 de Julio del 2021

Apellidos y Nombres del Asesor:	Firma
RUIZ BARRUETO MIGUEL ANGEL DNI: 42814146 ORCID 0000-0002-3373-4671	Firmado digitalmente por: MARUIZB el 21-07-2021 11:55:27

Código documento Trilce: TRI - 0140565