

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE VETERINARIA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DEL
ACEITE DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*) EN
BACTERIAS COMUNMENTE AISLADAS EN CAVIDAD
ORAL DE PERROS, A REALIZAR EN LOS AÑOS 2012 A
2013**

CONRADO HEMARIANO MARROQUÍN ALVAREZ

Médico Veterinario

GUATEMALA, AGOSTO DE 2015

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACION DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DEL ACEITE
DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*) EN BACTERIAS
COMUNMENTE AISLADAS EN CAVIDAD ORAL DE PERROS, A
REALIZAR EN LOS AÑOS 2012 A 2013**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD
POR**

CONRADO HEMARIANO MARROQUÍN ALVAREZ

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, AGOSTO DE 2015

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA**

DECANO: M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez

SECRETARIA: M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo

VOCAL I: M.Sc. Juan José Prem González

VOCAL II: Lic. Zoot. Edgar Amílcar García Pimentel

VOCAL III: M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco

VOCAL IV: Br. Javier Augusto Castro Vásquez

VOCAL V: Br. Andrea Analy García López

ASESORES

M.A. DORA ELENA CHANG DE JÓ

M.V. ANDREA LORENA PORTILLO GARCÍA

M.V. VIRGINIA BOLAÑOS DE CORZO

M.A. GUSTAVO ENRIQUE TARACENA

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

EVALUACION DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DEL ACEITE DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*) EN BACTERIAS COMUNMENTE AISLADAS EN CAVIDAD ORAL DE PERROS, A REALIZAR EN LOS AÑOS 2012 A 2013

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título de:

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO

A LA SANTISIMA TRINIDAD: Tres personas que han sido parte fundamental de mi fe y creadores de todo cuanto existe.

A LA VIRGEN MARIA: Madre de Dios y Madre mía, mi consoladora en los momentos de angustia y desesperación, mi abogada ante Dios Padre.

A MIS PADRES: Que desde pequeño me enseñaron a ser fuerte y constante, el valor de la familia, lo importante que es Dios en la vida propia y a respetar la palabra como referencia del honor.

A MIS ABUELOS: Personas con mucha sabiduría, sencillez y entrega, especialmente dedico este trabajo a mis abuelas Victoria Girón Guerra y Petrona Del Cid Valenzuela.

A MIS HERMANOS: Mis primeros amigos, cómplices en la niñez y mis puntos de apoyo en la vida cotidiana.

A MIS AMIGOS: A esas personas increíbles que a lo largo de mi vida y de mi carrera fui encontrando y se convirtieron en mi otra familia, gente importante que fue ganándose mi cariño y confianza.

AGRADECIMIENTOS

A LA SANTISIMA TRINIDAD: Que me proveyó los recursos, que me acompañó en los momentos difíciles para no perder la fe y que me inspiró en cada paso para poder culminar este mi gran sueño.

A LA VIRGEN MARIA: Que en los momentos difíciles ha estado conmigo consolándome como Madre, cuando me encontré solo.

A MI MADRE: Oralia Álvarez, quien jamás dejó de creer en mí, aun cuando todo dijera lo contrario, que me enseñó a soñar y a demostrarme que nada es imposible, estuvo ahí para apoyarme sin pedir nada a cambio, que ha estado siempre conmigo en mis horas de batallas perdidas y ganadas.

A MI PADRE: Conrado Marroquín, quien con su ejemplo me enseñó el amor por la familia, que jamás hay que rendirse, que el trabajo dignifica, que los árboles mueren de pie.

A MIS HERMANOS: Juan Daniel, Mónica, María José, Ana Lucía y Flor de María, Susan Judith y Gabriel Trujillo, gracias por ser fuertes conmigo y para mí.

A LIC. ZOOT. LUIS SAMAYOA: Tío Luis, muchísimas gracias por ayudarme a escribir mi futuro con sus sabias palabras.

A MIS AMIGOS: Giuseppe Agosta y Rev. Antonio Corcoles mis consejeros y amigos del alma, Ana Gabriela Suruy que además de amiga, increíble asesora de tesis, y su ayuda, Zulma Mayen, Alejandra Galich, Emilse Hernández y Werner Márquez mis

hermanos de la Facultad, un millón de gracias por cada segundo vivido con ustedes, Médico Veterinario Sergio Veliz un amigo que inspira, que ama lo que hace, un gran amigo; Juan Pablo Rodas, Carlos Vargas, Salvador Sanchinelli, Julio Ayala y Leonardo Montufar mis grandes amigos, gracias por estar cuando les necesito, darme su amistad sincera y su experiencia. Lourdez Álvarez (Yugurdez), cuantas pruebas superadas en el EPS gracias a usted mi querida amiga, no tengo más que mi amistad sincera para agradecerle. Xayana Argueta, Maibeth Díaz, señores Hector Pérez y Rolando Muñoz, amigos de Acatenango, Chimaltenango, nunca pensé encontrar gente buena y entregada. A todos los amigos que se quedaron en el tintero pero que seguro han escrito una magnífica historia conmigo.

A MIS ASESORES:

Gracias por su paciencia e interés, ustedes ayudaron que este proyecto de tesis se realizara con éxito, fue increíble la cantidad de conocimiento que adquirí gracias a que apostaron por este proyecto de investigación, en concreto, gracias M.A. Gustavo Enrique Taracena M.A. Dora Elena Chang, Dra. Andrea Lorena Portillo y Dra. Virginia Bolaños.

A MIS PROFESORES:

Que me transmitieron el conocimiento base de esta tan noble y fantástica forma de vida.

**A LOS DEPTOS DE
CITOHISTOLOGÍA Y
LIPRONAT (FCQF):**

Gracias por el apoyo incondicional y la increíble cantidad de conocimiento adquirido, fue un verdadero honor trabajar con ustedes.

**A LAB. DE MICROBIOLOGÍA
(FMVZ):**

Dra. Jacqueline Escobar, Martin y Henry (Técnicos-Laboratoristas) fueron de vital importancia para el desarrollo de este trabajo de tesis, mi gratitud por su paciencia, dedicación, por saber transmitirme sus conocimientos y sobre todo por su amistad.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	4
III. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo General.....	5
3.2 Objetivos Específicos.....	5
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1 Estructuras de soporte dentario.....	6
4.1.1 La encía.....	6
4.1.2 Periodonto y ligamento periodontal.....	7
4.1.3 Funciones del ligamento periodontal.....	9
4.2 Cemento.....	11
4.3 Proceso alveolar.....	12
4.4 Enfermedades periodontales.....	12
4.5 Halitosis.....	13
4.6 Gingivitis.....	14
4.7 Periodontitis.....	15
4.8 Orígenes y diseminación de las infecciones.....	16
4.9 Inmunidad de la cavidad oral.....	20
4.10 Origen y desarrollo de la microbiata bucal.....	21
4.11 Microbiata asociada con un periodonto sano.....	22
4.12 Factores que afectan el desarrollo de los microorganismos de cavidad bucal.....	23
4.13 Saliva.....	25
4.14 Factores determinantes de la composición en distintos nichos ecológicos.....	26
4.15 Adhesión por ácido lipoteicoico.....	28
4.16 Adhesión por polisacáridos extracelulares.....	28
4.17 Adhesión por unión lectina-carbohidrato.....	28

4.18	Adhesión por unión proteína-proteína.....	29
4.19	Retención por atrape físico.....	29
4.20	Receptores.....	30
4.21	Desarrollo y supervivencia.....	31
4.22	Biopelículas en la naturaleza.....	31
4.23	Biopelículas dentales.....	32
4.24	Formación y desarrollo de la biopelícula de placa dental.....	34
4.25	Mecanismos de formación.....	36
4.26	Colonización secundaria agregación interbacteriana.....	38
4.27	Complejidad, multiplicación y remodelación.....	39
4.28	Las biopelículas y su potencial patógeno.....	40
4.29	Biopelícula supragingival.....	42
4.30	Biopelícula subgingival.....	43
4.31	Las bacterias y su implicación en la halitosis.....	44
4.32	Microbiota asociada con gingivitis.....	45
4.33	Microbiota asociada con periodontitis crónica.....	46
4.34	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	47
4.35	Espiroquetas.....	48
4.36	Origen de las afecciones pulpares y periapicales.....	48
4.37	Enfermedades sistémicas y enfermedad periodontal de origen bacteriano.....	50
4.38	Clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	51
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
5.1	Materiales.....	56
5.1.1	Recursos humanos.....	56
5.1.2	Material biológico.....	56
5.1.3	Materiales y equipo.....	56
5.1.3.1	Materiales.....	56
5.1.3.2	Reactivos.....	57
5.1.3.3	Equipo.....	57

5.1.3.4	Cristalería.....	58
5.2	Metodología.....	58
5.2.1	Tamaño de la muestra.....	58
5.2.2	Toma de la muestra.....	58
5.2.3	Procedimiento de la muestra.....	59
5.2.4	Obtención del aceite esencial de clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	60
5.2.5	Preparación del agar, discos y soluciones.....	60
5.2.6	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	63
5.2.7	Diseño estadístico.....	63
5.2.7.1	Análisis estadístico.....	64
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
6.1	Resultados.....	65
6.2	Discusión de resultados.....	67
VII.	CONCLUSIONES.....	74
VIII.	RECOMENDACIONES.....	75
IX.	RESUMEN.....	76
	SUMMARY.....	77
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
XI.	ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1

Información de la procedencia de los perros muestreados para la evaluación del efecto bactericida in vitro del aceite de clavo de olor en cavidad oral de perros.....59

Cuadro No. 2

Referencias de referencia para la interpretación de resultados del enfrentamiento bacteriano al aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*) de acuerdo con el método Kirby-bauer.....64

Cuadro No.3

Evaluación del efecto bactericida in vitro del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y Enrofloxacina al 10% en bacterias aisladas en la cavidad oral de perros.....65

Cuadro No. 4

Resultados del comportamiento bacteriano individual frente a los tratamientos con aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y Enrofloxacina al 10% sin tomar en cuenta las concentraciones de cada tratamiento.....66

Cuadro No. 5

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), en las tres distintas concentraciones.....66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1

Siembra de hisopados en Agar Sangre y verificación del crecimiento bacteriano después de 24 horas de incubación.....93

Figura No. 2

Selección de bacterias e identificación de acuerdo a bioquímicas, tinciones y siembras.....93

Figura No. 3

Purificación de colonias y siembra en caldo nutritivo para su posterior enfrentamiento a los discos de difusión.....94

Figura No. 4

Preparación de Agar Muller-Hinton, marcaje de cajas de Petri según esquema y concentración, vaciado del Agar en cajas de Petri. (PEO, 2005).....95

Figura No. 5

Impregnación de discos de difusión con las concentraciones de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) (PEO, 2005).....96

Figura No. 6

Siembra de las bacterias a enfrentar al aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en el Agar. (PEO, 2005).....97

Figura No. 7

Posicionamiento de los discos de difusión según esquema en las placas de Petri conteniendo las bacterias sembradas en el Agar Muller-Hinton e incubación a 27 °C durante 24 horas. (PEO, 2005).....98

Figura No. 8

Resultados del enfrentamiento del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a las diferentes cepas bacterianas aisladas de los hisopados bucales de perros.....98

I. INTRODUCCIÓN

El periodonto normal proporciona el soporte necesario para mantener la función de los dientes. Consta de cuatro componentes principales: encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Estos tejidos (duros y blandos), están bajo la protección de factores inmunes inespecíficos y específicos que tienden a limitar la colonización microbiana, prevenir la penetración de sustancias nocivas a través de los tejidos y evitar así el daño que esto conlleva.

La boca cuenta con un sistema de defensa que pertenece al dominio gingival, que se activa por presencia antigénica de la biopelícula dental, por las endotoxinas de los microorganismos gram negativos, por la Inmunoglobulina A o por polisacáridos extracelulares venidos de la biopelícula supragingival. En la inmunidad mediada por células se encuentran los neutrófilos en gran proporción (90%) y el resto lo conforman células mononucleadas, linfocitos B y T, macrófagos y células plasmáticas (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Krauss, J. 2011; Newman, M. et al 2006).

La saliva posee factores inmunes inespecíficos que están constituidos, en animales carnívoros, por el lavado que hace la saliva, complementándose con las peroxidases. Todo lo anterior se suma al complejo de factores inmunes que sin necesidad de estímulo, actúan como aglutininas bacterianas, tales como la IgA que tiene función antiadherente.

La microbiota en un periodonto sano está formada por organismos “gram-positivos” (85%), junto a anaerobios facultativos. Mientras los factores normales de la cavidad oral se mantengan estables, las bacterias de la biopelícula se encuentran en equilibrio, pero si se rompe este equilibrio (consumo de azúcares, bajo pH, mala higiene bucal), se favorece el crecimiento de microorganismos que están en bajo número y producen enfermedades orales. Además de este

desequilibrio se provocan niveles elevados de enzimas que remueven la fibronectina de las células epiteliales, colonizando bacterias que destruyen los tejidos (Lobprise, H.2009 y Negroni, M. 2009).

Los gradientes de concentración de oxígeno presentes en las distintas áreas bucales, el pH salival y los carbohidratos tienen importancia ecológica, es decir que al perder el equilibrio, son factores importantes en el desarrollo bacteriano, debido a que las bacterias utilizan esta inestabilidad para su crecimiento, adherencia y multiplicación.

La halitosis, la gingivitis y la periodontitis son provocadas por la acción de subproductos de bacterias que se adhieren a la biopelícula formada por los compuestos salivales. Las enfermedades periodontales son las patologías más comunes en perros mayores de 3 años de edad; tomando en cuenta el tipo de alimento que consume el paciente, la raza y si recibe cuidados dentales por parte del dueño. (Lobprise, H. 2009; Negroni, M. 2009; Guerrero, D. 2008).

En algunos pacientes se ha establecido una asociación entre la periodontitis y las lesiones microscópicas de los sistemas hepático, renal y nervioso central. Las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, neumonías bacterianas y artritis, entre otras, son causadas también por procesos crónicos bacterianos bucales. (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Lobprise, H. 2009; Nakata, H. 2004).

El Aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*) se utiliza en estomatología humana por sus propiedades anestésicas y antisépticas. Cáceres, A. 1996 y González R. 2002 sostienen que la actividad antimicrobiana del Aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*) se atribuye al eugenol, que es su principio activo y que está concentrado en un 99% en aceite. El eugenol por ser un compuesto fenólico, en altas concentraciones, tiene la capacidad de degenerar las proteínas bacterianas y en bajas concentraciones las estabiliza; lo que

previene la penetración bacteriana a tejidos duros y blandos. (Cáceres, A. 1996; González, R. 2002).

En Colombia (2009), se enfrentó *Syzygium aromaticum*, contra *Clostridium Perfringens*, evaluando la actividad antibacteriana en agar SPS; donde el extracto etanólico y el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* fueron los que presentaron una menor concentración inhibitoria mínima (250 µl/ml). Mientras que en México (2008), se enfrentó el hongo *Fusarium* sp. aislado de *Carica papaya* a los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum*, donde se observó que *Syzygium aromaticum* junto a otros extractos exhibieron una inhibición del crecimiento micelial dependiente de la dosis al incrementarla de 100 a 300 µg/ml. (Ardila, M. et al 2008; Barrera, L. Gacia, L. 2009).

En este estudio se evaluará el efecto bactericida *in Vitro* del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en bacterias comúnmente aisladas en cavidad oral de perros.

II. HIPÓTESIS

El aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), si tiene efecto bactericida, in vitro, frente a las bacterias comúnmente aisladas de la boca de perros.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Generar información sobre terapias alternativas con plantas medicinales con efecto bactericida en la cavidad oral de perros.

3.2 Objetivos específicos

- Comprobar el efecto bactericida in vitro del Aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*), frente a las bacterias aisladas de la cavidad oral de perros.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), del Aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*), frente a las bacterias aisladas en la cavidad oral de perros.
- Determinar la bacteria aislada a partir de la cavidad oral de los perros, que presenta mayor sensibilidad in vitro al aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Estructuras de soporte dentario

4.1.1 La encía

La encía normal cubre el hueso alveolar y la raíz del diente hasta un nivel coronal a la unión amelocementaria. La encía se divide anatómicamente en las áreas marginal, insertada e interdental. Aunque cada tipo de encía presenta una variación considerable en cuanto a la diferenciación, la histología y el grosor, de acuerdo con sus exigencias funcionales, todos los tipos están estructurados específicamente para funcionar de manera apropiada contra el daño mecánico y microbiano. La estructura específica de diferentes tipos de encía refleja su efectividad como una barrera contra la penetración de microbios y agentes nocivos hacia el tejido más profundo (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Krauss, J. 2011; Newman, M. et al 2006).

La encía marginal, o no insertada, es el margen terminal o borde de la encía que rodea los dientes a manera de collar. Está delimitada desde la encía insertada adyacente por una depresión linear superficial, el surco gingival libre. La encía marginal, forma la pared de tejido blando del surco gingival.

El surco gingival es un surco poco profundo es el espacio alrededor del diente que conforma la superficie dental, por una parte, y el revestimiento epitelial del margen libre de la encía, por la otra. Tiene forma de "V" y apenas permite la entrada de una sonda periodontal. La determinación clínica de la profundidad del surco gingival es un parámetro diagnóstico importante. Bajo condiciones completamente normales o ideales, la profundidad del surco gingival debe ser considerada menor a 3 mm en perros y menor de 0.5 mm en gatos. Estas condiciones estrictas de normalidad sólo pueden producirse experimentalmente en

animales libres de gérmenes o después de un control intenso y prolongado de la placa (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

La encía insertada es la continuación de la marginal. Es firme, resistente y está unida fijamente al periostio del hueso alveolar. La superficie vestibular de la encía insertada se extiende hasta la mucosa alveolar relativamente laxa y móvil y está delimitada por la unión mucogingival. En el aspecto lingual de la mandíbula, la encía insertada termina en la unión de la mucosa alveolar lingual, que es la continuación de la membrana mucosa que recubre el piso de la boca. La superficie palatina de la encía insertada, en el maxilar se mezcla de forma imperceptible con la mucosa palatina, que tiene igual firmeza y resistencia (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

La encía interdental ocupa el nicho gingival, que es el espacio interproximal debajo del área de contacto del diente. La forma de la encía en el espacio interdental depende del punto de contacto entre los dos dientes contiguos, y de la presencia o ausencia de cierto grado de recesión. Las superficies vestibular y lingual convergen en el área de contacto interproximal, mientras que las superficies mesiales y distales son ligeramente cóncavas. Los bordes laterales y las puntas de las papilas interdentes están formados por la encía marginal de los dientes adyacentes. La porción intermedia está compuesta por la encía insertada. Si hay un diastema, la encía se inserta con firmeza en el hueso interdental y forma una superficie uniforme, redondeada, sin papilas interdentes (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

4.1.2 Periodonto y ligamento periodontal

El periodonto normal proporciona el soporte necesario para mantener la función de los dientes. Consta de cuatro componentes principales: encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Cada uno de ellos tiene una

ubicación, una arquitectura del tejido y una composición bioquímica y química diferentes, pero todos funcionan como una sola unidad. Investigaciones recientes han revelado que los componentes de la matriz extracelular de un compartimiento periodontal tiene influencia en las actividades celulares de las estructuras adyacentes. Por tanto, los cambios patológicos que ocurren en un componente periodontal pueden tener ramificaciones importantes en el mantenimiento, la reparación o la regeneración de otros componentes del periodonto (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Krauss, J. 2011; Newman, M. et al 2006).

El ligamento periodontal consta de un tejido conectivo con vascularidad compleja y altamente celular que rodea la raíz del diente y la conecta con la pared interna del hueso alveolar. Es la continuación del tejido conectivo de la encía y se comunica con los espacios medulares a través de los conductos vasculares del hueso. El espacio periodontal se reduce alrededor de los dientes que no funcionan y en los dientes no erupcionados, pero aumenta en los dientes que presentan hiperfunción. Este ligamento está compuesto por fibras periodontales que están formadas de colágeno de los tipos I III IV Y XII, la razón son las diferentes fuerzas de tensión que ejercen dándoles adecuadas flexibilidad y fuerza (Newman, M. et al 2006).

En el ligamento periodontal, se han identificado cuatro tipos de células en el ligamento periodontal: las de tejido conectivo, las de restos epiteliales, las del sistema inmunitario y las relacionadas con los elementos neurovasculares. Las células de tejido conectivo incluyen fibroblastos, cementoblastos y osteoblastos. Los fibroblastos son las células más comunes en el ligamento periodontal y aparecen como células ovoides o elongadas y se orientan a lo largo de las fibras principales mostrando prolongaciones tipo pseudópodos. Estas células sintetizan colágeno y tienen la capacidad de fagocitar fibras de colágeno antiguas y degradarlas por medio de hidrólisis enzimática. Por tanto los fibroblastos regulan el metabolismo del colágeno en un proceso de degradación intracelular de

colágeno que no afecta la acción de la colagenasa (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

Entre las células de defensa en el ligamento periodontal se incluyen neutrófilos, linfocitos, macrófagos, mastocitos y eosinófilos. Estas células, al igual que otras relacionadas con los elementos neurovasculares, son similares a las de otros tejidos conectivos.

4.1.3 Funciones del ligamento periodontal

Las funciones del ligamento periodontal se dividen en físicas, formativas y de remodelación, nutrición y sensoriales. Entre las funciones físicas se pueden mencionar:

- Provisión de un estuche de tejido blando para proteger a los vasos y nervios de lesiones causadas por fuerzas mecánicas.
- Trasmisión de fuerzas oclusivas al hueso
- Unión del diente con el hueso.
- Mantenimiento de los tejidos gingivales en relación adecuada con los dientes.
- Resistencia al impacto de fuerzas oclusivas (absorción del impacto).

Como parte de la función de formación y remodelación se menciona que las células de ligamento periodontal y el hueso alveolar se exponen a fuerzas físicas como respuesta a la masticación, la parafunción, el habla y el movimiento ortodóntico del diente. Las células del ligamento periodontal participan en la formación y resorción del cemento y el hueso, lo que ocurre en el movimiento fisiológico del diente; en la acomodación del periodoncio a fuerzas oclusivas; y en

la reparación de lesiones. Las variaciones en la actividad enzimática celular se correlacionan con el proceso de remodelación. Aunque las cargas aplicadas inducen cambios reactivos vasculares e inflamatorios en las células del ligamento periodontal, la evidencia actual sugiere que estas células tienen un mecanismo para responder directamente a las fuerzas mecánicas mediante la activación de diversos sistemas de señalización mecanosensorial, como la adenilato ciclasa, los canales iónicos activados por estrechamiento y cambios en la organización citoesquelética (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

El ligamento periodontal se encuentra bajo remodelación constante. Las células y fibras viejas se degradan y se reemplazan con nuevas, y se observa actividad mitótica en los fibroblastos y las células endoteliales. Los fibroblastos forman las fibras de colágeno y las células mesenquimatosas residuales se convierten en osteoblastos y cementoblastos. Por tanto el índice de formación y diferenciación de osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos afecta al índice de formación de colágeno, cemento y hueso (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

En la función nutricional y sensorial se puede mencionar que el ligamento periodontal proporciona nutrientes al cemento, hueso y la encía por medio de los vasos sanguíneos, y también aporta drenaje linfático. En relación con otros ligamentos y tendones, el ligamento periodontal es un tejido muy vascularizado. El contenido relativamente alto en vasos sanguíneos proporciona amortiguación hidrodinámica a las fuerzas aplicadas, además de índices altos de perfusión al ligamento periodontal (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

El ligamento periodontal cuenta con abundantes inervaciones de fibras nerviosas sensoriales capaces de transmitir sensaciones táctiles, de presión y de dolor por medio de las vías trigeminales. Los fascículos nerviosos pasan hacia el ligamento periodontal desde el área periapical y a través de canales del hueso

alveolar que siguen el camino de los vasos sanguíneos. Los haces se dividen en fibras mielinizadas únicas, que en algún momento pierden sus vainas de mielina y terminaciones libres, que tienen configuración en forma de árbol y transmiten la sensación de dolor; mecanorreceptores tipo Ruffini, cuya ubicación principal es el área apical; corpúsculos espirales de Meissner, también mecanorreceptores, que se encuentran sobre todo en la región radicular media, y terminaciones fusiformes de presión y vibración que están rodeadas por una cápsula fibrosa (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

4.2 Cemento

El cemento es el tejido mesenquimatoso calcificado avascular que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica. Los dos tipos principales de cemento son el acelular y el celular. Ambos constan de una matriz interfibrilar calcificada y de fibrillas de colágeno.

El cemento acelular es el primer cemento que se forma, cubre casi el tercio o la mitad cervical de la raíz, y no contienen células. Este cemento se forma antes de que el diente alcance el plano oclusivo; su papel principal es dar soporte al diente. El cemento celular, que se forma después de que el diente alcanza el plano oclusivo, es más irregular y contiene células en espacios individuales que se comunican entre sí a través de un sistema de canalículos conectados. El cemento celular está menos calcificado que el acelular (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Krauss, J. 2011; Newman, M. et al 2006).

Ambos tipos de cemento están dispuestos en laminillas separadas por líneas aumentativas paralelas al eje longitudinal de la raíz. Estas líneas representan los periodos de reposo en la formación del cemento y están más mineralizados que el cemento adyacente (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

4.3 Proceso alveolar

El proceso alveolar es la porción maxilar y mandibular que forma y sostiene los alveolos dentarios. Se forma cuando el diente erupciona para proporcionar inserción ósea al ligamento periodontal en formación; desaparece gradualmente. Los procesos alveolares se desarrollan y someten a remodelación con la formación y erupción del diente; son estructuras óseas que dependen del diente. Por lo tanto, el tamaño, la forma, la ubicación la función de los dientes, determinan su morfología. Lo curioso es que, a pesar del hecho de que el crecimiento y el desarrollo de los huesos de la mandíbula determinan la posición de los dientes, se logra cierto grado de reposicionamiento de los dientes mediante fuerzas oclusivas y como respuesta a procedimientos ortodónticos basados en la adaptabilidad del hueso alveolar y los tejidos periodontales relacionados (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Krauss, J. 2011; Newman, M. et al 2006).

Las enfermedades periodontales son definidas por Krauss J. (2011) como enfermedades multifactoriales que afectan el aparato de sostén del diente. Esto lo acentúa Guerrero, A. (2008) cuando asegura que las enfermedades periodontales son las patologías más comunes que se presentan en perros mayores de 3 años de edad, en donde se deben tomar en cuenta el tipo de alimento que consume el paciente, la raza, y si recibe o no cuidados dentales por parte del dueño. (Guerrero, D. 2008 Krauss J. 2011).

4.4 Enfermedades periodontales

Negróni, M. (2009), junto a Lobprise, H. (2009), sostiene que la halitosis, la gingivitis y la periodontitis son enfermedades periodontales que son provocadas por la acción de subproductos de bacterias que se adhieren a la biopelícula formada por los compuestos salivales, justo en el momento en que el paciente comienza a salivar; momentos después de la limpieza dental. Lobprise, H. (2009)

hace notar que bastan apenas de 6 a 8 horas para que la placa bacteriana se forme.

4.5 Halitosis

La halitosis es un olor repulsivo, que emana de la cavidad oral. También se le conoce como mal aliento, ozostomía, mal olor, fetor ex oris o fetor oris.

El olor a leche agria que acompaña a la enfermedad periodontal puede resultar de las poblaciones bacterianas asociadas a la placa, cálculos, tejidos enfermos o partículas de comida en descomposición retenidas dentro de la cavidad oral o del olor a carne podrida de la necrosis tisular. En contra de la creencia popular, ni el aire pulmonar normal ni el aroma estomacal contribuyen (Lobprise, H. 2009).

La causa más común es la enfermedad periodontal causada por la placa constituida por bacterias que son atraídas hacia una película acelular formada a partir de la precipitación de glucoproteínas salivales, descrita más ampliamente en párrafos posteriores (Lobprise, H. 2009).

La causa primaria del mal olor es la putrefacción bacteriana anaeróbica gramnegativa que genera compuestos sulfurosos volátiles, entre otros compuestos. Sin embargo, se deben tomar otras causas como consumo de comida maloliente, metabolismo (diabetes, uremia), causas respiratorias (megaesófago, neoplasia, cuerpo extraño), de origen dermatológico (pioderma del pliegue labial), dieta (productos alimenticios fétidos, coprofagia), y enfermedad oral (enfermedad periodontal y ulceración, ortodoncia, faringitis, tonsilitis, neoplasia, cuerpos extraños) (Lobprise, H. 2009).

En perros y gatos, ocurre generalmente en razas pequeñas y braquicefálicas.

Son las más predispuestas por tener dientes más juntos, los animales más pequeños viven más tiempo y los dueños tienden a alimentarlos con comida más blanda. Si la condición se debe a enfermedad oral, entonces puede haber tialismo, roce de la boca con la pata y anorexia (Lobprise, H. 2009).

4.6 Gingivitis

La gingivitis es una respuesta inflamatoria reversible de la línea de las encías marginales. Es la primera etapa de la enfermedad periodontal. A la gingivitis también se la denomina Fase 1 de la enfermedad periodontal. Las características principales de la gingivitis son: halitosis, encías eritrémicas o edematosas, en especial las superficies maxilares bucales; distintos grados de formación de placa y cálculo; superficies gingivales que sangran con facilidad al contacto. También se puede definir como la inflamación de los tejidos gingivales relacionados con diente sin pérdida previa de inserción o con un diente que ha presentado pérdida de inserción ósea, pero que en el momento no presenta pérdida de inserción ósea, aunque haya inflamación gingival. (Lobprise, H. 2009; Nelson, R. Cuoto, G.1999; Newman, M. et al 2006).

En esta enfermedad la encía cubre los procesos alveolares de los maxilares inferior y superior, y se amolda cerca del cuello del diente. En la boca de un mismo paciente puede haber gingivitis de diferente gravedad, en base a la inmunocompetencia del huésped y factores orales locales. La gingivitis temprana presenta una pequeña cantidad de placa, eritema leve sobre la línea de las encías y superficies gingivales lisas. La gingivitis avanzada presenta placa subgingival y cálculos, eritema moderado a grave y superficies gingivales irregulares (Lobprise, H. 2009).

La edad, la forma de la cabeza y patrón oclusivo (aglomeración dental en razas enanas y braquicefálicas), raza, alimentos blandos, respiración con la boca

abierta, hábitos de masticación, falta de cuidado de la salud dental, enfermedades metabólicas y enfermedad autoinmune como el pénfigo; son situaciones de riesgo para el paciente.

La gingivitis ocurre tanto en perros como en gatos y mas del 80% de los pacientes de 3 años de edad o más, tienen gingivitis. Las razas caninas enanas son las que presentan la enfermedad a temprana edad, pero los gatos en general, son afectados en avanzadas edades (Lobprise, H. 2009).

4.7 Periodontitis

La periodontitis implica la inflamación de algunas o todas las estructuras de apoyo del diente. Comparada con la gingivitis, la periodontitis indica cierto grado de pérdida de tejido de adhesión periodontal; como destrucción del cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Pueden ser afectados los perros y gatos de 6 meses de edad en adelante. (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Lopprise, H. 2009; Nelson, R. Cuoto, G.1999; Newman, M. et al 2006)

La barrera epitelial intacta y un alto margen de producción epitelial y exfoliación de la superficie impiden que las bacterias ganen acceso directo al tejido en el estado sano; sin embargo las fluctuaciones en el equilibrio entre parásito/patógeno y huésped, pueden resultar en ciclos de disminución o aumento de la respuesta inflamatoria. La periodontitis se considera como el resultado de una interacción huésped-parásito equilibrada de manera imperfecta (Lobprise, H. 2009; Newman, M. et al 2006).

A causa de las bacterias ubicadas en la fisura gingival, se forma al principio una película sobre la superficie esmaltada de un diente limpio. La película atrae bacterias aeróbicas grampositivas (actinomices y estreptococos en su mayoría); pronto se adhieren más bacterias y forman la placa. A los días, la placa se vuelve

más densa, se mineraliza y se transforma en cálculos, que son ásperos e irritantes para la encía; las bacterias subyacentes se quedan sin oxígeno, y bastoncitos anaeróbicos móviles y espiroquetas comienzan a poblar el área subgingival. Se forma más placa sobre la parte superior del cálculo; las endotoxinas liberadas por las bacterias anaeróbicas causan destrucción tisular y periodontitis con pérdida ósea (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Lobprise, H. 2009). Estos cambios llevan a la formación de “bolsas” periodontales. La formación de la bolsa periodontal se asocia con un infiltrado inflamatorio de neutrófilos, linfocitos y monocitos macrófagos. Los antígenos bacterianos y citocinas pro inflamatorias activan los linfocitos T y B infiltrativos. Los linfocitos y monocitos activados secretan un número de citocinas que participan en el proceso inflamatorio destructivo (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Newman, M. et al 2006).

En algunos pacientes se ha establecido una asociación entre la periodontitis y las lesiones microscópicas de los sistemas hepático, renal y nervioso central (Ettinger, S. Feldman, E. 2002; Lobprise, H. 2009; Nakata, H. 2004).

En perros las causas de periodontitis incluyen la gingivitis causada por *Streptococcus* y *Actinomyces spp.* También se ha visto que es causada por Bacteroides pigmentados y no pigmentados (*Porphyromonas denticanis*, *Porphyromonas salivosa*, *Porphyromonas gulae*, *Prevotella spp*, *Bacteroides spp*) y *Fusobacterium spp.* Las dietas blandas también son una causa importante pues promueven la enfermedad periodontal a través de la acumulación de placa (Lobprise, H. 2009).

4.8 Orígenes y diseminación de las infecciones

Lo anterior lo enriquecen Ross, P. y Habrook, P. (1987), cuando postulan que existen dos tipos de infección, estas son exógenas y endógenas. Las interacciones ecológicas que se producen en la cavidad bucal son las que determinan las características cualitativas y cuantitativas de la totalidad de su

microbiota, en los distintos nichos ecológicos y en las distintas situaciones de salud y enfermedad. Estos microorganismos coexisten en ecosistemas que están regulados por una serie de factores conocidos como determinantes ecológicos internos y externos. (Negroni, M. 2009)

En este punto se hace mención de los microorganismos comensales característicos de un área en particular; que tienen implícitas muchas funciones benéficas para su hospedero; pero a pesar de conformar la flora normal pueden producir infección, como en el caso de *Streptococcus sanguis* y *mitor*; que pueden producir infección en las válvulas cardíacas, previamente lesionadas, cuando penetran en el torrente sanguíneo procedentes de la boca después de una extracción dental. Recuerdan además que la caries dental también es una infección endógena. (Ross, P. Habrook P. 1987).

Las infecciones endógenas tienen dos características comunes:

- Son manifestaciones de una resistencia tisular disminuida o de lesión tisular.
- Los problemas de las infecciones endógenas por lo general se confinan al paciente; porque no son un riesgo alto de infección cruzada. (Ross, P. Habrook P. 1987).

Por otra parte, las infecciones exógenas derivan del hombre, los animales o el suelo; siendo el hombre la fuente más común de infección exógena ya sea como individuo que la padece o como portador. Ross, P y Habrook, P. (1987) amplían el término de portador y lo dividen en portadores sanos, convalecientes y crónicos. Los primeros albergan microorganismos en sus tejidos sin mostrar signos de infección clínica y por ello constituyen la forma más peligrosa de portador. Los portadores convalecientes son los que diseminan microorganismos por periodos variables después de una infección clínica. Existen también los

portadores por contacto, estos son quienes adquieren los microorganismos infectantes de un paciente pero no presentan manifestaciones clínicas aun cuando los organismos puedan haberse instalado en sus tejidos. (Ross, P. Habrook P. 1987).

Lo anterior trata de ilustrar el origen de las infecciones y sus formas de diseminación; sin embargo es importante comprender que en la cavidad oral existe una relación estrecha entre los microorganismos y su ambiente; donde la cavidad bucal se considera el ambiente, y sus propiedades influyen en la composición y la actividad de los microorganismos presentes. Los microorganismos que permanecen y se desarrollan en un hábitat particular, constituyen una comunidad microbiana formada por especies individuales.

No existe un período definido para la condición de portador convaleciente, por lo que tampoco existe una línea definida que demarque entre el fin de la convalecencia y el comienzo del portador crónico. El portador crónico es el individuo que salió de la condición de convalecencia de la enfermedad provocada por el agente patógeno, pero el portador continua diseminando dichos microorganismos. (Ross, P. Habrook P. 1987).

Tomando en cuenta que existen cuatro vías principales de recibir la infección, que comprenden las vías respiratorias, aparato digestivo, piel y mucosas y placenta, es necesario hacer mención de algunos tipos de contaminación y diseminación de las infecciones:

- Contaminación de los alimentos.
- Contaminación del agua
- Diseminación de infección por contacto directo.

- Contaminación de heridas. (Ross, P. Habrook P. 1987).

La contaminación del alimento puede suceder en su origen o en cualquier etapa de su manufactura, preparación o almacenaje. *Staphylococcus aureus* de la nariz y la piel de los manejadores de alimento y la especie *Salmonella* spp. de las manos, roedores y moscas, son ejemplos muy claros. El manejador de alimentos que es además portador asintomático de salmonellas, es una fuente peligrosa de infección. (Ross, P. Habrook P. 1987).

Las aguas contaminadas con heces y orina son fuente de infección importantes al ser ingeridas. Es importante la naturaleza de la bebida, porque las aguas muy alcalinas pueden interferir en la acción protectora del jugo gástrico. El brote epidemiológico de tifoidea de Aberdeen en 1964, aunque diseminado por carne enlatada contaminada, fue en realidad infección transportada por agua, ya que la usada para enfriar las latas después de la esterilización, estaba contaminada con aguas negras. Además varias latas fueron selladas de forma inadecuada, lo que condujo a la contaminación. (Ross, P. Habrook P. 1987).

La infección por contacto directo puede contraerse a través de la piel y las mucosas. Por otro lado, las heridas a consecuencia de traumatismo, las abrasiones y picaduras pueden colonizarse por microorganismo patógenos del ambiente. A veces la infección de las heridas constituyen un riesgo de trabajo y las grietas de la piel se contaminan en forma accidental, con microorganismos procedentes de cualquier material que se esté manipulando. La implantación de organismos bucales en abrasiones de la piel de la mano del dentista, también pueden conducir a infección. (Ross, P. Habrook P. 1987).

La sepsis de las heridas quirúrgicas es uno de los mayores problemas infecciosos en hospitales y las causas de éstas son innumerables. Una herida

quirúrgica es susceptible a la infección desde el momento de la infección hasta que ha sanado totalmente, y por lo tanto está expuesta tanto en el quirófano como en la sala de recuperación. Las operaciones y otros procedimientos quirúrgicos, las técnicas de vendaje, la contaminación ambiental y los actores humanos, todos están implicados en las infecciones cruzadas que surgen en hospitales. La infección endógena de heridas tiene también gran importancia. (Negroni M. 2009)

4.9 Inmunidad de la cavidad oral

Negroni, M. (2009) sostiene que los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal están bajo la protección de factores inmunes inespecíficos y específicos que tienden a limitar la colonización microbiana, prevenir la penetración de sustancias nocivas a través de los tejidos y evitar así el daño que esto conlleva. El hospedador cuenta con factores que interrelacionan con la microbiota de la cavidad bucal, entre los cuales, se destacan las mucosas y tejidos periodontales íntegros, junto a la calidad y cantidad de constituyentes de la saliva y del exudado gingival, bajo la influencia de los componentes humorales y celulares del sistema inmune (Negroni M. 2009).

La saliva posee factores inmunes inespecíficos que están constituidos en humanos por lisozima, sistema lactoperoxidasa y lactoferrina, mientras que en veterinaria se habla solamente del lavado que realiza la misma saliva que se complementa con las peroxidases que producen algunos estreptococos; también otros componentes se suman al complejo de factores inmunes, estos son componentes que pueden comportarse como aglutininas bacterianas y no están sujetos a una estimulación específica. Dentro de los componentes de la inmunidad específica, se destaca la IgA, secretada activamente en la saliva en condiciones normales. (Negroni, M.2009; Tizard, I. 2009)

La IgA salival es sensible a un grupo de enzimas denominadas IgA1 protea-

sas secretadas por estreptococos del grupo *sanguinis* y por especies de *Capnocytophaga*. Las IgA1 proteasas se comportan como factores de virulencia de estos microorganismos, dividen a la molécula de IgA y la tornan incapaz de llevar a cabo sus funciones antiadherentes contra los microorganismos, que así colonizan las piezas dentarias y las mucosas. (Negroni M. 2009)

4.10 Origen y desarrollo de la microbiota bucal

La cavidad oral fetal en útero se encuentra libre de microorganismos, pero a partir del nacimiento, queda expuesta esta cavidad a la microbiota del tracto vaginal materno, de donde aparecen microorganismos de las especies *corinebacterium*, lactobacilos, coliformes y cocos anaerobios facultativos, anaerobios estrictos y algunas veces protozoos. (Negroni M. 2009)

Los microorganismos que colonizan al recién nacido a partir de las ocho horas del alumbramiento, constituyen la denominada “comunidad pionera”. Los primeros en instalarse y los más abundantes son los estreptococos en la lengua y las mucosas. La cavidad bucal es selectiva y los microorganismos que ingresan en ella no siempre son capaces de establecerse en nichos ecológicos. (Negroni M. 2009)

El medio bucal experimenta sus mayores cambios alrededor de los seis meses de vida en humanos y al mes en perros, en el momento de la erupción de piezas dentarias primarias. La microbiota presente, al complementarse la dentición primaria y más tarde la dentición permanente, conforma la “comunidad clímax”. (Negroni M. 2009)

La adquisición de la microbiota bucal normal sigue un desarrollo ecológico específico que se denomina “sucesión ecológica”; se reconocen una sucesión alogénica y otra autogénica. En la primera sucesión el desarrollo de la comunidad

está influido por factores no microbianos, como la aparición de las piezas dentarias; la calidad y la cantidad de los microorganismos que componen la comunidad clímax varía durante la vida de los individuos de acuerdo con los factores que influyen en su distribución, promoviendo o limitando su desarrollo. (Negroni M. 2009)

La boca también cuenta con un sistema de defensa que pertenece al dominio gingival, que se activa ante la presencia de antígenos de la biopelícula dental, o por una vía alternativa, mediante las endotoxinas de los microorganismos gram- negativos, por la cadena J de la inmunoglobulina A o por polisacáridos extracelulares provenientes de la biopelícula supragingival. Dentro de las inmunoglobulinas existe predominio de IgG sobre IgA, de origen sérico: la Ig G1 es la que se encuentra en mayor proporción. Dentro de la inmunidad mediada por células existe una elevada proporción de neutrófilos, que representan el 90% de los elementos celulares. El resto está constituido por células mononucleadas, linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y células plasmáticas.

En las distintas enfermedades periodontales hay mayor o menor cantidad de citocinas, elementos enzimáticos lisosómicos, enzimas bacterianas, endotoxinas, etc. (Negroni M. 2009).

4.11 Microbiota asociada con un periodonto sano

Cuando una superficie dentaria sana está expuesta a las bacterias que forman la biopelícula, éstas se unen a la superficie del diente y se extienden descendiendo hacia el interior del surco gingival. La microbiota está formada principalmente por bacterias grampositivas en un 85%, en especial cocos, y un 75% de bacterias anaerobias facultativas. Los estudios microbiológicos generalmente concuerdan en que los microorganismos del surco gingival sano consisten en relativamente pocas células, predominantemente grampositivas, constituidas por

especies de estreptococos y actinomices (75%). Los cultivos bacterianos han demostrado un predominio de estreptococos, sobre todo de *S. sanguinis*. A menudo hay especies de actinomices, que incluyen *A. viscosus* y *A. naeslundii*.

Los bacilos gramnegativos y las espiroquetas están presentes en bajo número o no se detectan dentro de la microbiota de un surco sano. (Lobprice, H. 2009; Negroni, M. 2009).

4.12 Factores que afectan el desarrollo de los microorganismos de cavidad bucal

La temperatura de la cavidad bucal es más baja que la temperatura normal del cuerpo (oscila entre 35 y 36°C). Esta temperatura resulta óptima para el desarrollo de un amplio espectro de microorganismos. Los factores que pueden ser influidos por la temperatura incluyen pH, actividad iónica, solubilidad de los gases y agregación de macromoléculas. (Negroni M. 2009)

La cavidad bucal es rica en oxígeno y puede ser colonizada por una variedad de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y aun anaerobios si no existe oxígeno. En la cavidad bucal y especialmente en la biopelícula dental hay diversos gradientes de concentración de oxígeno y oxido-reducción. Los microorganismos con gran capacidad de tolerancia al oxígeno pueden sobrevivir en la biopelícula durante más tiempo. Sin embargo se debe pensar que la mayoría de los microorganismos presentes en la cavidad bucal requieren un pH cercano a la neutralidad. El pH está regulado por la saliva. En el pH salival normal, los niveles de acidez de la biopelícula dental pueden diferir notablemente y dependen de la cantidad de ácido producido por los microorganismos presentes en cada sector de la biopelícula. Las bacterias que producen cantidades importantes de ácido como los *S. mutans* y *Lactobacillus spp.* se conocen como acidogénicas. (Negroni M. 2009)

El crecimiento y el desarrollo de numerosos microorganismos depende de la presencia de dióxido de carbono; para muchas especies la concentración necesaria es de alrededor del 0.03%. Algunos gérmenes, como *Aggregatibacter Capnocytophaga*, dependen del CO₂ para llevar a cabo sus procesos metabólicos. (Negroni M. 2009)

Los nutrientes son un factor muy importante en el desarrollo bacteriano. Estos a su vez se dividen según su origen en Nutrientes exógenos y Nutrientes endógenos. Los nutrientes exógenos comprenden a los carbohidratos que son los que tienen importancia ecológica en la cavidad bucal; son utilizados por los microorganismos de la placa cariogénica para producir energía, conformar la matriz de la placa y generar un medio ácido que actúa como factor limitante, porque permite el desarrollo de microorganismos acidógenos y acidúricos, como los estreptococos y los lactobacilos. (Negroni M. 2009)

También los aminoácidos juegan un papel importante debido a los subproductos que generan las bacterias a partir de estos. Algunas bacterias originan amoníaco a partir de la arginina, cadaverina a partir de la lisina o histamina a partir de la histidina, originan compuestos que pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno por otros microorganismos. (Negroni M. 2009)

Algunas de las aminas y el amoníaco resultantes pueden ser dañinos para los tejidos del hospedador.

Para Negroni M. (2009), entre los nutrientes endógenos, se encuentra el fluido gingival o crevicular por ser un derivado del suero que se encuentra en el surco gingival. En él se detectan albúmina, glucoproteínas, lipoproteínas, hemina M, α 2-globulina, sodio, potasio, calcio, magnesio y fosfatos inorgánicos. Algunos de estos elementos como la hemina y la α 2-globulina, son imprescindibles para el desarrollo de las bacterias del biofilm subgingival (*Porfiromonas*, *Prevotella*).

En presencia de cuadros inflamatorios aumenta la cantidad de fluido gingival. Este fluido gingival posee hasta treinta veces más proteínas que el suero y elementos plasmáticos celulares, como neutrófilos polimorfonucleares y enzimas proteolíticas. También aparecen productos bacterianos como las endotoxinas y productos de degradación del sistema inmune del hospedador (Negróni M. 2009).

También son importantes los nutrientes provenientes de interacciones bacterianas; ya que algunas bacterias, denominadas primeros consumidores, utilizan únicamente los productos disponibles; elaboran como fruto de su metabolismo sustancias que otras bacterias aprovechan y por eso a éstas se les denomina consumidores secundarios. (Negróni M. 2009)

4.13 Saliva

La saliva se considera como un sistema con factores múltiples que actúan en conjunto e influyen en el estado de salud y enfermedad de la cavidad bucal. El volumen salival segregado por una persona varía entre 700 y 800 ml diarios, mientras que durante experimentos hechos en Estados Unidos de América, perros de 15 a 20 kilogramos (Kg.) de peso vivo excretaron un rango de 75 a 150 centímetros cúbicos de saliva parotídea y de 100 a 300 centímetros cúbicos de saliva de otras glándulas salivales. (Negróni M. 2009; Swenson, J. Reece, W. 1999; Beer, E. Wilson, W. ____)

La composición de la saliva está relacionada con el flujo y su característica serosa, mucosa o mixta, de acuerdo con su origen glandular, pero además se ve influenciada por múltiples factores relacionados con el estilo de vida, el estado de salud y enfermedad y la administración de determinadas medicaciones; la secreción basal de las glándulas submaxilar y parótida de animales no rumiantes es notablemente hipotónica, y mientras el flujo secretor aumenta, la concentración de sodio, cloro y HCO₃ se incrementa, el líquido secretado es casi isotónico en

volúmenes máximos de flujo. El pH salival es importante, debido a que los cambios en el mismo afectan también a la flora bucal, los valores según un estudio realizado en Estados Unidos, el rango está comprendido entre valores de 7.4 a 7.9, esto se debe a que la saliva es carente de mucina que es una proteína, la cual tienen propiedades acidogénicas y es responsable también de la viscosidad salival. Todos los factores cuentan en el momento de establecer el nivel de riesgo que posee el hospedador para padecer caries dental o enfermedades periodontales. (Negrón M. 2009; Swenson, J. Reece, W. 1999; Beer, E. Wilson, W. ____).

4.14 Factores determinantes de la composición microbiana en distintos nichos ecológicos

Cada superficie dentaria, cada unión dentogingival, constituye un nicho ecológico diferente. En cada uno hay elementos del sistema inmune específico e inespecífico que modulan el accionar de los microorganismos allí presentes. Asimismo, las bacterias grampositivas y gramnegativas utilizan mecanismos propios del “quórum sensing”, fenómeno mediante el cual la acumulación de moléculas con función señalizadora permite a una bacteria saber el número de bacterias de determinadas especies que se encuentran en el medio (densidad poblacional) y cuándo ha alcanzado dicha densidad un valor crítico para que respondan de una manera fijada genéticamente (la respuesta comprende emitiendo luz en el caso de bacterias luminiscentes o sustancias viscosas para adherirse a otras en un sustrato, en el caso de bacterias que forman biopelículas para iniciar infección); para regular sus actividades fisiológicas.

En el medio aparecen moléculas, denominadas autoinductores, que regulan la expresión de genes y aumentan en relación directa con la concentración y la función de la población microbiana que ocupa determinado nicho ecológico. La comunicación por autoinductores ocurre tanto entre bacterias de la misma

especie como entre especies diferentes. La composición microbiana de cada nicho ecológico depende entonces de la capacidad de los microorganismos para cumplir con tres etapas: adherencia, desarrollo y supervivencia (Negroni M. 2009; Piqueras, M. 2001, Krauss, J. 2011).

Negroni, M. (2009) al referirse a la adherencia microbiana, se refiere al hecho de que solo los microorganismos que pueden adherirse y permanecer en la cavidad bucal tienen la oportunidad de comenzar a crecer, multiplicarse, sobrevivir y establecerse como miembros de la microbiota bucal; gran parte de los microorganismos que ingresan se eliminan y sólo un pequeño porcentaje puede adherirse y persistir. La adhesión consiste en un fenómeno de interrelación que se establece entre los microorganismos y los tejidos del hospedador (Negroni M. 2009).

El principal mecanismo de adherencia de las bacterias gramnegativas y de muchas grampositivas consiste en la interacción específica entre dos moléculas, una bacteriana o “adhesina” y otra del tejido del hospedador denominada “receptor”. El paso previo a la adhesión de los microorganismos al diente implica la interacción entre las adhesinas bacterianas y las macromoléculas que constituyen la película adquirida. Este mecanismo puede fijar microorganismos a material artificial biocompatible o a las propias bacterias; esto da lugar a los siguientes fenómenos de agregación y coagregación bacterianas. Las adhesinas más conocidas son enzimas del tipo glucosiltransferasas (GTF), glucanos solubles e insolubles, residuos de carbohidratos y proteínas superficiales de la pared celular (lectinas), proteínas que se fijan a la película adquirida, proteínas contenidas en las fimbrias y ácido lipoteicoico (Negroni M. 2009).

Los mecanismos de adherencia microbiana más reconocidos son:

- Adhesión por ácido lipoteicoico.

- Adhesión por polisacáridos extracelulares.
- Adhesión por unión lectina-carbohidrato.
- Adhesión por unión proteína-proteína.
- Retención por atrape físico.

4.15 Adhesión por ácido lipoteicoico

Este ácido que es un polímero aniónico, compuesto por fosfatos azucarados, generalmente glicerol y ribitol fosfato, deriva de la membrana plasmática y penetra en la pared celular de los estreptococos grampositivos. De este modo, el microorganismo se presenta con una potente carga electronegativa que le permite adherirse al ion calcio de la saliva y a través de éste, que actúa como puente, a la película acelular adquirida. Este mecanismo es el que utiliza *S. sanguinis* cuando no hay sacarosa en el medio; origina un biofilm con bajo potencial acidogénico y no cariogénico (Negroni M. 2009).

4.16 Adhesión por polisacáridos extracelulares

En este proceso intervienen glucanos insolubles (mutanos) y proteínas superficiales que fijan glucanos y glucosiltransferasas, como en el caso de *Streptococcus mutans*. (Negroni M. 2009)

4.17 Adhesión por unión lectina-carbohidrato

Las lectinas son péptidos de proteínas que reconocen residuos de glúcidos y se fijan a ellos. Estas uniones se producen en la película acelular adquirida (porción glucosídica) mediante las fimbrias y las proteínas de superficie de algunos microorganismos. Así, en la película adquirida se ven residuos de

galactosa como receptores para antígenos superficiales (proteínas) presentes en *S. mutans*; mientras que los residuos de ácido siálico son receptores para *S. sanguinis*. Este tipo de unión se da también en los casos de coagregación bacteriana en los que las fimbrias tipo 2 de *Actinomyces viscosus* interactúan con residuos de galactosa de *S. sanguinis* (Negroni M. 2009).

4.18 Adhesión por unión proteína-proteína

Los análisis electroforéticos (en estudios realizados con humanos) han demostrado que las proteínas salivales que primero promueven la adhesión son las ricas en prolina (PRP), seguidas por las que contienen la proteína estateriana. *Actinomyces viscosus* se une a las PRP de la película acelular mediante sus fimbrias tipo 1, se comportan como adhesinas y también favorecen los fenómenos de coagregación. Esta coagregación puede ser específica para distintas bacterias. Así formas filamentosas grampositivas se coagregan a formas cocoides grampositivas u otras gramnegativas. De esta forma a *Actinomyces viscosus* y *A. naeslundii* se le agregan *Veillonella*, *S. sanguinis* y/o *S. mitis* o *gordonii*. Conformando las imágenes de mazorca de maíz o corncob (Negroni M. 2009).

Otro tipo de adhesión da como resultado agrupaciones denominadas “en cepillo”, presentes en la placa subgingival. En este caso a un bacilo central (gramnegativo) se le adosan perpendicularmente otras bacterias con la misma morfología (*Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*) (Negroni M. 2009).

4.19 Retención por atrape físico

Muchos microorganismos de la cavidad bucal quedan simplemente retenidos en fosas y fisuras dentarias, en el surco gingival o en bolsas periodontales e incluso dentro de la matriz de la biopelícula. Así, los estreptococos se amontonan

en fosas y fisuras mientras que los treponemas, los vibrios y porfiromonas se encuentran predominantemente en el surco gingival (Negroni M. 2009).

4.20 Receptores

Los receptores de los tejidos son reconocidos por las adhesinas de los microorganismos que colonizan las mucosas o el tejido dentario. Los componentes de la saliva se adhieren a las bacterias, causan agregación y así facilitan su eliminación. En la saliva y el fluido gingival de los pacientes humanos con enfermedad periodontal y mala higiene bucal, se detectan niveles elevados de proteasas, como tripsina y colagenasas, y varias glucosidasas del tipo neuraminidasa. Estas enzimas derivan de células inflamatorias asociadas con la alteración gingival y con la persistencia de la biopelícula (Negroni M. 2009, Krauss, J. 2011).

Los altos niveles de proteasas favorecen la remoción de la fibronectina de las superficies de las células epiteliales y así los receptores quedan expuestos a los microorganismos autóctonos asociados con las enfermedades periodontales y a aquellos que llegan por vía exógena, como *Pseudomona aeruginosa*, que se establece en el lugar en el que *S. sanguinis* se adhiere naturalmente. Enzimas como la tripsina generan nuevos receptores que promueven la adhesión de *Porphyromonas gingivalis* a los tejidos del hospedador (Negroni M. 2009).

En forma similar, la neuraminidasa remueve los residuos terminales del ácido sálico y expone residuos de galactosil que funcionan como un nuevo receptor, el que interactúa con la adhesina galactosil de *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia*. Las cepas de *Porphyromonas gingivalis* tienen afinidad por los receptores del colágeno. Por lo tanto, es factible que esta propiedad desempeñe una función importante al

facilitar la invasión de *P. gingivalis* a través de las membranas basales y su posterior penetración en el tejido conectivo gingival (Negroni M. 2009).

La afinidad de varios estreptococos cariogénicos, en particular *S. rattus* y *S. cricetus*, por el colágeno facilita la penetración bacteriana en el cemento y la dentina, y así promueve el avance de la caries dental.

4.21 Desarrollo y supervivencia

La microbiota bucal está compuesta por microorganismos que se desarrollan y sobreviven en la cavidad bucal. La supervivencia depende de la regulación dada por los determinantes ecológicos anteriormente mencionados (Negroni M. 2009).

4.22 Biopelículas en la naturaleza

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados:

- Bacterias planctónicas, de libre formación.
- Bacterias sésiles que forman parte de la biopelícula.

En cualquier parte de la naturaleza una biopelícula es una comunidad microbiana sésil. Caracterizada por células irreversiblemente unidas a un sustrato o interface y entre sí, embebidas en una matriz extracelular de sustancias polimerizadas producidas por ellas y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al grado de multiplicación celular y transcripción de genes. Estas estructuras que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas, y están formadas por un 15 -25% de células y un 75 – 85% de agua y matriz extracelular, generalmente polisacáridos, que las bacterias segregan, aunque puede contener también proteínas, ácidos nucleicos, restos de plaquetas, fibrina y calcio. En esa

comunidad heterogénea, de estructura compleja, los microorganismos conviven, cooperan, se comunican por sistemas de señales, (quorum sensing) que dirigen el fenotipo y regulan la expresión de genes que nunca se expresan en las formas planctónicas. Esta acumulación de señales químicas depende de la densidad bacteriana. En esas estructuras hay distintos microambientes (Negróni M. 2009).

La hidrodinámica juega un papel importante en el desarrollo de la biopelícula, pues estas organizaciones se desarrollan en una interface líquido – sólido, donde la velocidad del flujo que lo atraviesa influye en el desprendimiento físico de los microorganismos. La formación y la estructura de una biopelícula dependen de las características del sustrato al cual se une y a otros aspectos del medio ambiente. Así, las biopelículas en una superficie mucosa son fisiológicamente diferentes de aquellos formados en superficies inertes. Se ha acuñado el término “biopelícula de mucosa” para describir aquellas que son características de las mucosas. Éstas, aunque estrechamente relacionadas con las encontradas en superficies inertes, no son idénticas en cuanto a su expresión génica, ni en la naturaleza de sus microambientes. Las biopelículas de mucosas son moduladas por la respuesta inflamatoria del huésped y, además, por proteínas y células del huésped que contribuyen a su composición (Negróni M. 2009).

La característica de las biopelículas es su resistencia a los antimicrobianos locales y sistémicos, al estrés ambiental y a las defensas del hospedador (Negróni M. 2009, Krauss, J. 2011).

4.23 Biopelículas dentales

Las bacterias que se encuentran en la saliva pueden ser consideradas bacterias planctónicas (que flotan en fase líquida). Las biopelículas pueden desarrollarse por medio de dos tipos de procesos:

- A partir de una célula planctónica.
- A partir de otra biopelícula: estas células desprendidas mantendrían todas las propiedades de la biopelícula de donde proceden.

Las bacterias expresan ciertos genes y comienzan a secretar un exopolisacárido, producen estructuras similares a setas atravesadas por canales. El exopolisacárido depende de la bacteria que se trate, pero también está influenciado por el medio. Posteriormente se modifican las condiciones medioambientales locales; el lugar se torna un medio favorable para la colonización de especies anaerobias. Estos últimos colonizadores se unen a especies bacterianas ya adheridas a través de la coagregación. De esta manera, se formarán biopelículas estructuralmente complejas compuestas por diversas especies de microorganismos (Negroni M. 2009).

La biopelícula dental, con el tiempo, se convierte en una estructura organizada con organismos que ocupan posiciones particulares definidas, debido a las propiedades biológicas y físicas del sitio en el que se encuentran; es lo que algunos investigadores han denominado “mosaico de microorganismos”. Esta combinación de especies dentro de la biopelícula no sería aleatoria, sino que existirían asociaciones específicas entre bacterias (Negroni M. 2009).

Las características a resaltar de los biofilms o biopelículas dentales son las siguientes:

- Las comunidades de bacterias están asociadas entre sí de modo que unas colaboran en el desarrollo de otras comunidades. Las diferentes comunidades exhiben una cooperación metabólica, como el intercambio de nutrientes.

- Las comunidades que componen las biopelículas poseen microambientes radicalmente diferentes: variaciones de pH, concentraciones de oxígeno y potenciales eléctricos; esto permite nichos adecuados a todas las especies.
- Dentro del biofilm existe un sistema circulatorio primitivo formado por canales de agua, que permite intercambio metabólico y de señales.
- Los biofilms proporcionan seguridad a las comunidades que la componen, ya que son capaces de resistir las defensas del hospedador y los antibióticos sistémicos, locales antisépticos. (Krauss, J. 2011; Negroni, M. 2009).

4.24 Formación y desarrollo de la biopelícula de placa dental

S. Mitis, *S. oralis* y *S. sanguinis* presentan adhesinas de alta afinidad con los componentes de la película salival adquirida. Al mismo tiempo la capacidad que poseen para la producción de IgA1-proteasas no producidas por *S. mutans*, le confieren una ventaja ecológica adicional para comportarse como estreptococos pioneros en el establecimiento de la comunidad biótica que constituye la biopelícula (Negroni M. 2009).

Los grupos de bacterias se comportan como comunidades estructuradas en tres dimensiones, con canales por los que fluye el transporte de sustratos, productos de desecho y moléculas claves para su organización. La matriz que sostiene la biopelícula es una mezcla de polisacáridos, proteínas y DNA secretado por las células; estas sustancias permiten que el biofilm funcione como sistema. El metabolismo y las propiedades de difusión de la biopelícula son influenciadas por distintos factores, entre los que se describen: la calidad y la cantidad de saliva del medio bucal, los hábitos dietéticos, la higiene y el contenido de fluoruros, los

distintos gradientes de sustancias químicas, y las condiciones de oxigenación, entre otros (Negroni M. 2009, Krauss, J. 2011).

La formación de la biopelícula se produce en respuesta a las condiciones ambientales. Existen sistemas de fosfotransferencia que transmiten la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental. El equilibrio fisiológico entre las piezas dentarias y la biopelícula puede alterarse dependiendo de las características del medio bucal. El pH bajo, causado por la fermentación de los carbohidratos, selecciona la población de cepas acidógenas y acidúricas, tales como los estreptococos del grupo mutans (*S. mutans*, *S. sobrinus*) y lactobacilos. Las bacterias en el interior de la biopelícula son metabólicamente activas y causan fluctuaciones del pH. Estas fluctuaciones pueden llevar a una pérdida de minerales de las piezas dentarias, cuando el pH desciende (<5.5) o ganancia de ellos cuando el pH aumenta. Los resultados de estos procesos de desmineralización-rem mineralización pueden conducir a la disolución de los tejidos duros y a la formación de la lesión de caries (Negroni M. 2009 Piqueras, M. 2001, Krauss, J. 2011).

La progresión de la lesión de caries posee la capacidad de alterar el microambiente, modificando a su vez la biota local y la composición de la biopelícula; de este modo, se privilegia el desarrollo de taxones bacterianos acidogénicos y acidúricos. Diversos autores consideran que la aparición del *S. mutans* es precedida generalmente por la proliferación de bacterias acidogénicas de diversos taxones. Se ha descrito a la biopelícula como una estructura formada por dos matrices principales:

- La capa salival o cutícula acelular adquirida.
- La capa formada por microorganismos y polímeros extracelulares.

La cutícula acelular adquirida se define como una biopelícula delgada, amorfa y electrodensa inmediatamente adyacente a la superficie del esmalte dental. El grosor varía de sitio, pero se ha estimado en 1 a 2 μm . Numerosos estudios muestran que la película adquirida del esmalte se forma en no más de dos horas en una superficie dental limpia. Ésta se denomina “cutícula temprana” o película temprana, carece de bacterias y sus productos están formados por proteínas y glucoproteínas. Esta película temprana muestra un alto contenido de treonina, serina y alanina, pero menos prolina, que la saliva lo que indica que se lleva a cabo una adsorción selectiva de los componentes salivales en la superficie dentaria (Negroni M. 2009).

En las cutículas las fosfoproteínas de la saliva participan en el proceso de remineralización-desmineralización, y así controlan la solubilidad de las superficies mineralizadas y previenen la formación del cálculo (Negroni M. 2009).

4.25 Mecanismos de formación

En la formación de la película interviene una combinación de fuerzas físico-iónicas, hidrófobas, de Van der Waals y, además, se detecta fijación de hidrógeno entre la superficie dentaria y los componentes orgánicos e inorgánicos de la saliva. El esmalte limpio tiene más grupos accesibles de fosfatos que iones de calcio. La adsorción de moléculas en esta superficie engloba la interacción de los grupos fosfato con los iones de calcio de la saliva para formar puentes de carga negativa (carboxil-fosfato-sulfato y ácido siálico). Algunos microorganismos, producen una enzima, neuraminidasa, que separa los residuos de ácido siálico terminal en la cutícula temprana y la saliva para exponer productos que actúan como receptores para la adhesión de proteínas fijadoras (adhesinas) de otros microorganismos (Negroni M. 2009).

Algunas enzimas presentes en esta película, como las glucosiltransferasas,

contribuyen a facilitar la adhesión de los microorganismos a la superficie dental. Con el tiempo la película temprana sufre modificaciones y se transforma en una película tardía en la que se asocian componentes de la saliva, productos bacterianos y exudado gingival.

La capa formada por microorganismos y polímeros extracelulares está comprendida por varias fases que se tienen en cuenta para la formación de la biopelícula de placa dental cariogénica. Una vez establecida la película adquirida, comienzan a depositarse, colonizan, las primeras poblaciones bacterianas. Este biofilm suele estar compuesto por 20 – 30 especies bacterianas distintas. Mientras el resto de los factores se mantienen constantes, las bacterias de la biopelícula se encuentran en equilibrio; caso contrario, se produce un desequilibrio (consumo de azúcares, bajo pH, mala higiene bucal) en la población bacteriana y se favorece el desarrollo de especies que estaban en bajo número (*S. mutans* y lactobacilos) (Negroni M. 2009, Krauss, J. 2011).

Los mecanismos que intervienen en la adhesión a la película adquirida son interacciones físico-químicas que comprenden:

- Un mecanismo reversible: mediante fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas entre estreptococos y actinomicetes.
- Un mecanismo irreversible: es el mecanismo de adhesión a la película adquirida donde participan las adhesinas microbianas y los receptores del hospedador.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la adsorción selectiva de las bacterias sobre la película, sobre otras bacterias o sobre biopelícula formada con anterioridad. La existencia de cargas negativas sobre las bacterias y las glucoproteínas tienden a dificultar la unión entre ambas. Los iones calcio

presentes en la saliva pueden neutralizar estas cargas y actuar como puentes entre la película y las bacterias; se forman agregados de glucoproteínas-calcio-bacterias (Negróni M. 2009).

El papel de *S. mutans* en esta es variable, hay placas no cariogénicas en las que se los encuentra en bajo número o ausentes, en especial con poca sacarosa en el medio. Los componentes salivales adsorbidos sirven como receptores para las proteínas de unión de *S. mutans*, mientras que las glucosiltransferasas (Gtf) y los glucanos adsorbidos refuerzan esa adherencia. Un factor interesante son las defensas específicas del hospedador. Al estar presentes en la película anticuerpos naturales contra especies específicas realizarían uniones iniciales, selectivas. También se han descrito proteasas específicas producidas por *S. sanguinis* que inhibirían la acción antiadherente de la IgA (Negróni M. 2009).

4.26 Colonización secundaria: agregación interbacteriana

La biopelícula sufre modificaciones estructurales y aumenta en grosor y complejidad. En esta etapa se producen fenómenos de coadhesión interbacteriana intraespecífica e intergenérica.

Coadhesión intraespecífica:

- A través de los constituyentes de la saliva: *S. sanguinis*, *S. orlis*, *A. naeslundii*.
- A través de los PEC (mutanos): *S. mutans* y *A. naeslundii*.

La coadhesión intergenérica se lleva a cabo a través de los constituyentes de la superficie de las bacterias de diferentes géneros y especies asociados a

fimbrias o fibrillas. Tal es el caso de la agregación entre *A. naeslundii* y estreptococos orales, como *S. gordonii*, *S. mitis* y *S. mutans* (Negroni M. 2009).

4.27 Complejidad, multiplicación y remodelación

Al principio la biopelícula está formada por cocos grampositivos, pero posteriormente se desarrolla una población compleja de otros cocos, bacilos y filamentos grampositivos. Las condiciones acidogénicas creadas por los colonizadores primarios facilitan el desarrollo de especies diferentes, que prefieren un medio ácido para su desarrollo. Esta etapa permite la maduración bacteriológica y estructural. En estas condiciones la biopelícula es un conglomerado bacteriano proliferante y enzimáticamente activo que está fuertemente adherido a la superficie dentaria y para persistir necesita energía que toma de los hidratos de carbono fermentables.

Los hidratos de carbono son desdoblados por la vía glucolítica; a través de esta vía la bacteria obtiene ATP; además se forma CO₂ y ácido láctico, y en menor proporción otros ácidos orgánicos, como ácido butírico, ácido acético, etc. Estos ácidos van a producir la desmineralización de los cristales de hidroxiapatita dentales para comenzar su degeneración (Negroni M. 2009).

Esta fase, que se inicia a las 48 horas, continúa indefinidamente. El número total de microorganismos permanece constante, pero la composición microbiana es más compleja. Las encargadas de regular la expresión de genes, en relación directa con la concentración y la función de la comunidad microbiana que ocupa cada sitio, donde pueden desarrollarse caries, son las moléculas autoinductoras que conforman el sistema "quórum sensing". Cuando los microorganismos que forman la biopelícula cariogénica alcanzan un número suficiente (masa crítica), segregan los péptidos que, a pequeñas dosis, son identificados por receptores

externos de las bacterias, lo cual les permite desarrollar factores de virulencia (Negroni M. 2009).

Sobre la base de estas dosis de proteínas, las bacterias perciben cuándo aumenta su concentración y determinan cuándo se encuentran en condiciones numéricas apropiadas y con la información genética necesaria para actuar como patógenas, agrediendo al hospedador. Este fenómeno constituye el fundamento del “quórum sensing” (Negroni M. 2009; Piqueras, M. 2001).

4.28 Las biopelículas y su potencial patógeno

Costerton (1987) definió la biopelícula como “una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un sustrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes” (Negroni M. 2009).

Entre las características generales de las biopelículas se puede mencionar:

- Están conformadas por comunidades microbianas, donde participan distintos géneros y especies bacterianas.
- Los microorganismos forman microcolonias, cuya arquitectura semeja torres o setas.
- Los microorganismos que la constituyen están contenidos en una matriz formada principalmente por polisacáridos extracelulares.
- Los canales que atraviesan la estructura de la biopelícula favorecen el flujo de nutrientes, productos de excreción, enzimas, metabolitos y oxígeno.

- Los microorganismos se comunican entre sí por señales químicas, a partir de las cuales se activan mecanismos para producir nuevas proteínas y enzimas. Se expresan genes que dan lugar a cambios fenotípicos en la comunidad.
- Los microorganismos incluidos en ellas son menos sensibles a la acción de antisépticos, antibióticos y a fagocitosis. (Negroni M. 2009).

Existe una relación de la biopelícula con la etiopatogenia de caries dental y enfermedad periodontal, la biopelícula de placa dental ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de la caries dental y las enfermedades periodontales. Para explicar la formación de esta biopelícula se manejan tres hipótesis:

- Hipótesis no específica
- Hipótesis específica
- Hipótesis ecológica

La hipótesis no específica explica que es más importante la cantidad de microorganismos y no considera los distintos grados de virulencia que pueden poseer. De acuerdo con la hipótesis específica, la caries dental y las enfermedades periodontales se consideran problemas microecológicos iniciados por poblaciones selectivas de microorganismos sobre superficies específicas; no todas las placas o biopelículas causan enfermedad. Una biopelícula con predominio de microorganismos grampositivos, acidogénicos y acidúricos está relacionada con la etiología de caries dental mientras que otra, donde haya mayor proporción de microorganismos proteolíticos y gramnegativos, es considerada una placa periodonto-patogénica (Negroni M. 2009).

La hipótesis ecológica propuesta por Marsh (1997) postula que el balance entre las condiciones que brinda el hospedador con los microorganismos de la cavidad bucal y aquellos que constituyen la biopelícula condiciona la aparición de la enfermedad; los microorganismos se van regulando unos a otros. El proceso de regulación en la biopelícula es dinámico, donde las condiciones externas van a producir alteraciones en la expresión de los genes requeridos para su formación, conlleva a la modificación del microambiente por sus propios habitantes, los que sufren alteraciones genéticas adicionales que le otorgan mayor o menor grado de virulencia y patogenicidad (Negroni M. 2009).

4.29 Biopelícula supragingival

La formación de la biopelícula supragingival se inicia sobre la superficie dental cercana al margen gingival y en dos etapas:

La primera involucra la adherencia bacteriana a la superficie dentaria y la segunda implica la multiplicación, la coagregación y la maduración de microorganismos, lo que determina la sucesión microbiana. En esta biopelícula se han observado dos tipos de sucesiones, de las cuales, una denominada autogénica que es el cambio sincrónico del ambiente y la comunidad, y que se debe a la actividad de los propios organismos, y otra denominada alogénica que es la sustitución de las especies como resultado de cambios ambientales relativamente grandes que escapan al control de los organismos autóctonos. La interacción entre los factores microbianos y no microbianos de un ecosistema conduce finalmente a una estabilización; ésta es la comunidad clímax. Se mantiene en el tiempo y refleja una situación dinámica en que las células mueren y se sustituyen. El clímax puede modificarse por las fuerzas exógenas, aunque tiende a ser restaurado a su estado original. En otros momentos, pueden alterarse los ambientes irrevesiblemente; esto lleva a un estado de equilibrio y en diferente clímax de la comunidad (Negroni M. 2009).

El desarrollo de gingivitis es un ejemplo de sucesión microbiana, así como la interacción de las especies y el hábitat. Los trabajos de Loe y de Theilade, y sus respectivos colaboradores, demostraron que la biopelícula dental causó gingivitis, relacionando específicamente este trastorno con la aparición de las bacterias gramnegativas. Se ha sugerido recientemente que los patógenos periodontales no actúan aisladamente, y la interacción entre especies patogénicas y benéficas afectan la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento; de forma parecida, Lobprise, H. 2009, relaciona las enfermedades periodontales con la presencia de bacterias gramnegativas, pero de manera contraria a Negroni, M. (2009), sostiene que la microflora gram-positiva, cocoide, aerobias e inmóvil, que es primaria, es cambiada totalmente por bacterias gramnegativas, móviles y anaerobias (Negroni M. 2009).

4.30 Biopelícula subgingival

La biopelícula subgingival está ubicada a nivel del espacio virtual del surco gingival escasamente colonizado en estado de salud periodontal. Sin embargo, la cantidad y la diversidad de microorganismos aumentan en enfermedad. Debido a los aspectos morfológicos del surco gingival y la bolsa periodontal, los microorganismos se encuentran menos sujetos a las actividades de limpieza homeostática. Con la acumulación y la maduración de la biopelícula supragingival, se producen cambios inflamatorios que modifican las relaciones anatómicas entre el margen gingival y la superficie dentaria, y el resultado es un nuevo ambiente ecológico, protegido por el medio bucal supragingival y con acceso al fluido gingival. El establecimiento y las proporciones relativas de microorganismos subgingivales en estos sitios profundos están influenciados por células epiteliales e inflamatorias y por los productos finales del metabolismo bacteriano (Negroni M. 2009).

Esta área retentiva determina un medio en el cual pueden colonizar los mi-

microorganismos que no se adhieren con facilidad de las superficies duras, pero sí pueden adherirse a otras bacterias y al epitelio de la bolsa. La luz de la bolsa es un acceso directo a los nutrientes (principalmente proteínas) presentes en el líquido gingival y la biopelícula supragingival proporciona un ambiente físico, con un bajo potencial de óxido-reducción, que permite que lleguen a establecerse las bacterias anaerobias. En estas condiciones locales los factores ambientales del hospedador facilitan una microbiota subgingival específica, cuyo aumento genera un cambio patológico (Negroni M. 2009).

Las observaciones realizadas con el microscopio electrónico en dientes humanos extraídos con tejidos adyacentes han sido importantes para conocer la colonización de los microorganismos en los sitios subgingivales. Estos estudios demostraron que las bacterias y otros microorganismos de la placa subgingival vinculada con el epitelio pueden penetrar en el tejido conectivo gingival y colonizarlo. En la formación de la biopelícula subgingival también existe una combinación de reacciones de adhesión, coagregación y unión de microorganismos, y pueden distinguirse tres zonas:

- Relacionada con el diente
- No adherida o libre flotante
- Relacionada con el epitelio (Negroni M. 2009)

4.31 Las bacterias y su implicación en la halitosis

Como ya se ha dicho, las bacterias son atraídas hacia la biopelícula formada a partir de la precipitación de los componentes salivales y deshechos. Esta biopelícula sobre el diente recién limpiado y pulido tan pronto como el paciente comienza a salivar. Las bacterias se adhieren a la película dentro de las 6 u 8

horas. A los días, la placa se mineraliza y produce cálculos en animales de compañía (Lobprise, H. 2009; Negroni, M. 2009).

La superficie áspera del cálculo atrae más bacterias al mismo tiempo que irrita la encía libre. Mientras sigue la inflamación, el surco gingival se transforma, en sentido patológico, en cavidad periodontal; la cavidad acumula restos de comida putrefacta, productos de degradación bacteriana y hueso resorbente, lo que lleva a la halitosis. La causa primaria del mal olor es la putrefacción bacteriana anaeróbica gramnegativa que genera compuestos sulfurosos volátiles, como el sulfuro de hidrógeno, metilmercaptano, sulfuro de dimetilo y ácidos grasos volátiles (Lobprise, H. 2009).

Los compuestos sulfurosos volátiles también pueden jugar un rol en la enfermedad periodontal al afectar la integridad de la barrera tisular, permitiendo que las endotoxinas produzcan destrucción periodontal, endotoxemia y bacteremia (Lobprise, H. 2009).

4.32 Microbiota asociada con gingivitis

En la gingivitis hay aumento en el espesor de la biopelícula y una microbiota más compleja. Se ha postulado que la transición entre la salud y la gingivitis es debido a un crecimiento excesivo de especies grampositivas. Sin embargo, otros investigadores han encontrado una proporción aumentada de especies gramnegativas. De hecho, las condiciones inflamatorias proporcionan un ambiente relativamente anaerobio que favorece la colonización por bacilos móviles y espiroquetas. Los cultivos del biofilm, en gingivitis, tienen desarrollo de especies de Actinomyces, estreptococos, Veillonella, Fusobacterium y Treponemas, Prevotella intermedia y especies de Campylobacter. (Negroni, M. 2009)

Para Lobprise, H. (2009), en los animales sanos, predominan los cocos y ba-

cilos aeróbicos grampositivos en la placa supragingival; los anaerobios son más abundantes a nivel subgingival y las espiroquetas se encuentran amontonadas en la región apical del surco gingival. Con el desarrollo de la gingivitis, los anaerobios y las espiroquetas se vuelven cada vez más abundantes en el surco gingival.

Los organismos *Bacteroides Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas spp* y *Fusobacterium spp* parecen ser patógenos importantes en los perros. Las *Porphyromonas* y *Peptostreptococcus spp* son muestras comunes de los gatos con gingivitis. Los organismos gramnegativos aumentan en número a medida que la gingivitis se desarrolla. Invaden los tejidos y elaboran endotoxinas que pueden resultar en destrucción tisular (Lobprise, H. 2009).

El hecho de que esas bacterias estén presentes en animales enfermos y sanos, y de que la enfermedad periodontal no progrese de modo lineal indica que la interacción con las bacterias huéspedes es importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Lobprise, H.2009).

4.33 Microbiota asociada con periodontitis crónica

Las principales características de esta microbiota son: biopelícula supragingival abundante. La microbiota subgingival prevalente son microorganismos anaerobios en un 90%, de los cuales el 60% son gramnegativos, espiroquetas en un 30% y muy escasos cocos. Los estudios de los microorganismos subgingivales predominantes en las lesiones de la periodontitis crónica en humanos, han revelado la gran diversidad microbiana. No hay aún evidencia directa para concluir qué especies bacterianas comienzan el primer paso en el desarrollo de la bolsa periodontal.

La microbiota subgingival de sitios sanos de pacientes sanos difiere de la encontrada en sitios sanos de pacientes con periodontitis crónica, lo que hace

pensar que los sitios sanos en pacientes con periodontitis sufrirían mayor riesgo de futura pérdida de inserción. La microbiota que se detectó en sitios con periodontitis fueron espiroquetas y *Porphyromonas gingivalis* (Negroni, M. 2009).

La periodontitis agresiva es una infección que ataca a sitios periodontales múltiples o individuales dentro de la cavidad bucal. Los hallazgos encontrados en las formas localizada y generalizada de estas periodontitis son:

- Rápida pérdida de inserción y destrucción ósea.
- Existe una respuesta excesiva del fenotipo de los macrófagos, incluyendo niveles elevados de prostaglandina E2 e interleucina - 1 β

La cantidad de los depósitos microbianos presentes no concuerda con la severidad de la destrucción del tejido periodontal (Negroni, M. 2009).

4.34 *Porphyromonas gingivalis*

Es un cocobacilo gramnegativo, anaerobio obligado, no móvil. Esta especie presenta una elevada correlación con la progresión de la enfermedad, severidad y pérdida de hueso. Produce un gran número de factores de virulencia: enzimas (hidrolíticas, proteolíticas, lipolíticas y tripsina), otras proteínas y productos terminales de su metabolismo que son activas frente a un amplio espectro de proteínas del huésped. Posee un mecanismo de evasión para las defensas del hospedador, lo que favorece la progresión de la enfermedad (Negroni, M. 2009).

Otro factor es la capacidad de adherirse a una diversidad de tejidos y células del hospedador, la habilidad de invasión y multiplicación, las fimbrias se comportan como adhesinas y posibilitan a *P. gingivalis* la adherencia y la coagregación, especialmente observada entre *P. gingivalis* y *Fusobacterium*

nucleatum, microorganismo considerado puente de la microbiota subgingival. Las proteinasas de *P. gingivalis* degradan los tipos I y IV de colágeno, principales componentes del tejido conectivo y proteínas de la matriz intercelular. Existen evidencias de que el lipopolisacárido de *P. gingivalis*, especialmente su lípido A, es capaz de estimular la respuesta inflamatoria del hospedador indirectamente a través de la producción de citocinas. Su cantidad aumenta o disminuye en relación con la reactivación o remisión, respectivamente (Negroni, M. 2009).

4.35 Espiroquetas

Las espiroquetas no son prevalentes en las primeras etapas de colonización microbiana. Sin embargo, con el tiempo aumenta su prevalencia en presencia de tejidos inflamados. Todas las espiroquetas bucales están clasificadas dentro de los treponemas. Las técnicas de biología molecular han revelado la presencia de aproximadamente sesenta especies pertenecientes al género en la cavidad bucal, de las cuales cerca de un 80% aún no han sido cultivadas (Negroni, M. 2009).

Las espiroquetas pueden dañar las células del hospedador, infiltrarse a través de la matriz extracelular e iniciar o modular la respuesta inflamatoria y de destrucción de los tejidos periodontales. Liberan proteasas; la dentalisina y peptidasas que determinan la capacidad invasora de los treponemas. *Treponema denticola* produce una enzima tipo tripsina, una peptidasa que puede contribuir a la degradación de los sustratos proteicos y degradar o modificar las quimionas y otros mediadores inflamatorios (Negroni, M. 2009).

4.36 Origen de las afecciones pulpares y periapicales

La mayor parte de las afecciones pulpares y periapicales son inducidas como resultado directo o indirecto de la intervención de bacterias orales. Toda lesión pulpar puede dar por resultado una inflamación y sus consecuencias, tales

como mayor permeabilidad vascular, vasodilatación, dolor, sin descartar necrosis pulpar (Alvarado, E. 2001).

Algunos microorganismos que se encuentran en la cavidad oral no son patógenos en su hábitat normal, pero en condiciones adecuadas como inflamación o infección, pueden iniciar o exacerbar una patología. Existe un alto riesgo en provocar infección en el conducto radicular por manipulación con instrumentos no estériles (Alvarado, E. 2001).

Lo anterior se ilustra con un estudio en donde Kakehashi y asociados expusieron las pulpas dentales de ratas convencionales y de ratas gnotobióticas (libres de microorganismos patógenos desconocidos) a su propia flora bacteriana, dando esto como resultado el desarrollo de lesiones pulpares y periapicales en el primer grupo de ratas; no siendo así en las gnotobiotas. Investigadores suecos examinaron en una serie de experimentos la importancia de las bacterias en el desarrollo de las lesiones periapicales, seccionando pulpas de mono, las cuales fueron tratadas de la siguiente forma:

- Luego de ser seccionada la pulpa se selló inmediatamente.
- Se dejó la pulpa expuesta a la flora oral durante una semana y luego se procedió a sellarla.

Luego de siete meses en el primer grupo no se presentaron cambios periapicales, mientras que en el segundo se observó una reacción inflamatoria; lo que confirma la influencia de las bacterias orales en las lesiones periapicales (Alvarado, E. 2001; Riera, L. 2006).

4.37 Enfermedades sistémicas y enfermedad periodontal de origen bacteriano

En algunos pacientes se ha establecido una asociación entre la periodontitis y las lesiones microscópicas de los sistemas hepático, renal y nervioso central; incluso se piensa que en humanos, también provoca bajo peso al nacimiento y bebés prematuros. La asociación entre infección materna y bebés prematuros con bajo peso fue demostrada y se conserva relacionada con la presencia de toxinas bacterianas y mediadores inflamatorios sistémicos y placentarios (Ettinguer, S. Feldman, E. 2002; Lobprise, H. 2009; Nakata, H. 2004).

Las bacterias crean sus propios nichos ecológicos usando la saliva y el fluido de la gingivitis crevicular como sus principales fuentes nutritivas, en la superficie dental, surco gingival, dorso lingual y mucosa bucal y faríngea; desde donde eventualmente (vía bacteremia) derivan en procesos sistémicos. Como concepto general está establecido que los focos sépticos son responsables del inicio y progresión de una variedad de enfermedades inflamatorias como: artritis, úlcera péptica y apendicitis (Nakata, H. 2004).

Las bacterias presentes en la cavidad bucal, más abundantes en casos de sepsis bucal, puede (y de hecho lo hacen) ingresar al torrente sanguíneo durante la manipulación de los tejidos orales; que van desde los simples detrajados dentales hasta las intervenciones de orden quirúrgico. Está establecido que las infecciones orales, especialmente la periodontitis, afectan el curso y patogénesis de varias enfermedades sistémicas, entre otras: la enfermedad cardiovascular, neumonía bacteriana, diabetes mellitus y bajo peso vivo de neonatos. Los mecanismos propuestos son:

- Infecciones metastásicas desde la cavidad oral luego de transitoria bacteriemia: Endocarditis, abscesos cerebrales, sinusitis, Angina de

Ludwing, celulitis orbital, osteomielitis, úlcera cutánea, pústulas palmares y plantares.

- Lesión metastásica por las toxinas circulantes de las bacterias orales: Enfermedad de la arteria coronaria, alteraciones en la gestación, fiebre persistente, neuralgia trigeminal idiopática, dolor atípico facial, infarto agudo miocárdial.
- Inflamación metastásica por injurias autoinmunes inducidas por las bacterias orales: Enfermedad de Bechet, Enfermedad de Crohn, Enteritis, uveítis. (Ettinguer, S. Feldman, E. 2002; Nakata, H. 2004).

En la bibliografía veterinaria, numerosos informes anecdóticos sugirieron que la enfermedad periodontal tiene efectos sistémicos en caninos y felinos. Un estudio demostró una correlación positiva entre la intensidad de la enfermedad periodontal y los cambios microscópicos en diversos órganos y tejidos de los perros; los resultados de este estudio sugirieron que la enfermedad periodontal puede asociarse con efectos sistémicos en los perros. En este informe, se estableció una asociación entre la magnitud de la enfermedad periodontal y la presencia de cambios histopatológicos en el miocardio y los tejidos renales y hepáticos. La producción y secreción de citocinas y moléculas inflamatorias potencialmente tóxicas continúan en tanto persistan las placas bacterianas (Ettinguer, S. Feldman, E. 2002).

4.38 Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

El árbol de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), pertenece a la familia de las Myrtaceas, siempre verde que puede llegar hasta los 15 metros (mt.) de alto. Las hojas son simples, oblongo-lanceoladas, acuminadas; las flores son poco numerosas, en corimbos terminales, tubo de cáliz turbinado, 1 centímetro (cm.) de

largo, lóbulos largos, redondos, con pétalos glandulosos, 1-2 cm. de largo. El fruto es ovalado, rojo o amarillo pálido, una semilla cubierta por cuatro cálices globosos. Es nativo de de las islas Molucas (sudeste asiático) y en Guatemala, se cultiva en la región norte, en lugares con 150 – 300 cm. de precipitación anual (Cáceres, A. 1996).

Es una planta que prefiere suelos arcillosos con mucho humus y se propaga por semillas. La fertilización es orgánica y debe regarse en la época seca durante los primeros 2 -3 años. La cosecha empieza a los 4 - 5 años, durante los primeros 3 meses del año. Los manojos de clavos se recogen manualmente, cuando la yema ha alcanzado su máximo desarrollo; secándolos al sol durante 4 – 5 días, perdiendo 2/3 de su peso original. El rendimiento varía entre 3 – 7 kg. de clavo seco por árbol (Cáceres, A. 1996).

Los botones florales machacados se usan en enjuagues bucales y masticados para el dolor de muelas. El fruto se usa para tratar interna y externamente afecciones digestivas, respiratorias y cardíacas. El polvo y decocción se usan interna y externamente en el tratamiento de induraciones, verrugas, tumores y ciertas formas de cáncer. La tintura se usa para tratar afecciones digestivas y bajar la fiebre.

Estudios antimicrobianos demuestran que el aceite esencia y el extracto etanólico son antibacterianos y antifúngicos a concentraciones de 1:800 – 1:16,000; la tintura del fruto es activo contra bacterias y *C. albicans*. El polvo del fruto es activo contra *S. aureus*, el aceite esencial es antibacteriano, antifúngico y analgésico (Cáceres, A. 1996).

La oleorresina y el aceite esencial son muy usados en odontología como antiséptico y anestésico. El extracto metanólico tiene actividad antiinflamatoria en

el edema de la oreja del ratón inducido por acetato de tetradecanoilforbol y posiblemente inhibidor de promotores tumorales (Cáceres, A. 1996).

El botón floral contiene aceite esencial (15 – 20 %) rico en eugenol (70 – 79%), acetato de eugenilo (< 10%), hidrocarburos sesquiterpenicos, compuestos oxigenados no fenólicos (5%), y flavonoides. La corteza contiene trimetileter del ácido elágico, β -sitosterol y amirina.

El análisis proximal de 100 gramos (g.) del botón floral seco indica: 430 calorías, 5.4g de humedad, 6.3 g de proteína, 13.2 g de aceite volátil, 15.5 g de grasa no volátil, 11.1 g de fimbria, 57.7g de carbohidratos totales, 5 g de materia mineral, 0.24 g de ceniza insoluble en ácido, 0.7 g de calcio, 0.11 g de fósforo, 0.01 g de hierro, 0.25 g de sodio, 1.2 g de potasio, 0.11 mg de vitamina B1, 0.04 mg de vitamina B2, 1.5 mg de niacina, 80.9 mg de vitamina C, 175 UI de vitamina A (Cáceres, A. 1996).

La materia médica es el botón floral que tiene olor aromático, picante y ligeramente astringente. La actividad antimicrobiana se atribuye al eugenol que es activo contra *S. aureus*, *E.coli* y *C. albicans*. La Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del polvo del fruto contra *S. aureus* es 2mg/ml; el extracto metanólico es activo contra *S. mutans* (CIM= 0.8 mg); el extracto acuoso es inactivo. La eugenina tiene actividad antiviral contra Herpes simplex (10 mg/ml). El extracto estimula la secreción y eliminando los gases; es un potente ascaricida, en dosis de 0.1 – 1.0 g /Kg del extracto alcohólico o del aceite se expulsan los A. lumbricoides sin efectos adversos (Cáceres, A. 1996).

El aceite se obtiene de botones florales y hojas; botones con rendimiento de 15 – 20 % y hojas 2 – 3%. El eugenol (ácido cariofílico) se obtiene por extracción del aceite con KOH y rectificación con CO₂. Se usa como analgésico, carminativo, espasmolítico y antiséptico; en odontología como analgésico dental y relleno

temporal de cavidades con óxido de cinc. Es un líquido incoloro – amarillento, picante, se oscurece al contacto con el aire, es insoluble en agua pero si en etanol, cloroformo y éter, su aroma particular proviene de trazas de otros elementos como metil-n-amilcetona. El acetato de eugenilo es un sólido cristalino, que con el aceite poseen actividad anestésica, sedante e hipotérmica (Cáceres, A. 1996).

El aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) se utiliza en estomatología humana por sus propiedades anestésicas y antisépticas. Se combina con óxido de cinc formando eugenolato de cinc como cemento pulpar provisional, para proteger los muñones de dientes que han sido preparados para corona, y cementar provisionalmente una corona prefabricada de aluminio. Cáceres, A. 1996 y González R. 2002 sostienen que la actividad antimicrobiana del Aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*) se atribuye al eugenol, que es su principio activo y que está concentrado en un 99% en aceite. El eugenol por ser un compuesto fenólico, en altas concentraciones, tiene la capacidad de degenerar las proteínas bacterianas y en bajas concentraciones las estabiliza; lo que previene la penetración bacteriana a conductos dentinarios. (Cáceres, A. 1996; González, R. 2002).

En Colombia, (2009), un estudio realizado enfrentamiento de aceites esenciales de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus bulgaris* contra *Clostridium Perfringens*, se evaluó la actividad antibacteriana en agar SPS; donde el extracto etanólico y el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* fueron los que presentaron una menor concentración inhibitoria mínima (250 µl/ml). Mientras que en México (2008), se realizó un estudio en donde se enfrentó el hongo *Fusarium* sp. aislado de *Carica papaya* a los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum zylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Tloxys ambrosioides*, *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia*, *Ruta chalepensis*, *Mentha piperita* y *Eucalyptus globutus*; donde se observó que *Syzygium aromaticum* junto a *Teloxys ambrosiolides* y *Cinnamomum*

zwylanicum, exhibieron una inhibición del crecimiento micelial dependiente de la dosis al incrementarla de 100 a 300 µg/ml. (Ardila, M. et al 2008; Barrera, L. Gacia, L. 2009).

En Guatemala, no se han hecho investigaciones acerca del efecto bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en boca de perros; por lo que en este estudio evaluaré el efecto bactericida in vitro del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), en bacterias comúnmente aisladas en la cavidad oral de perros; para que con los resultados que obtenga, se pueda tomar en cuenta en evaluaciones in vivo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos humanos

- 01 Estudiante tesista
- 04 Asesores de Tesis
- Colaboradores: Licda. Zully Cruz, Licda. Isabel Gaitán y personal de los laboratorios donde se realizará la fase experimental.

5.1.2 Material biológico

- Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).
- Hisopados bucales de 10 perros.
- Cepas bacterianas comúnmente aisladas de los hisopados.

5.1.3 Materiales y Equipo

5.1.3.1 Materiales

- Algodón
- Asa de nicromo
- Cajas de Petri simples y cuadriplate
- Guantes de examen clínico
- Hisopos estériles
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Pipetas automáticas

- Micropipetas
- Puntas de 200 y 1000 μL
- Regla graduada en mm.

5.1.3.2 Reactivos

- Medios de cultivo y pruebas bioquímicas: Caldo tripticasa soya, agar Muller Hinton, agar sabouraud, agar-Agar, Medio Stuart, Agar sangre, Agar MacConkey, Medio Tioglicolato, caldo Base Fenol Rojo y Manitol (o Lactosa), Agar TSI, Agar de Simmons Citrato, Caldo MRVP, Medio SIM, Agar Urea, Medio Gelatina, Agar en tubo, Agar Sangre, Agar BHI, Agar Macconkey, Agar Rambach, Tioglicolato, pruebas de oxidasa y catalasa, Agar By Parker, Chromocult, Medio Simons Citrato, medio VP.
- Solución salina isotónica.
- Solventes: agua desmineralizada, Dimetil-sulfoxido, Alcohol etílico al 50%.
- Enrofloxacinina inyectable al 10%.

5.1.3.3 Equipo

- Agitador
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza semi analítica
- Balanza de humedad
- Campanas bacteriológicas con y sin flujo laminar
- Campana de humos
- Incubadoras a 27°C y 37°C
- Refrigeradora a 5°C
- Estufa

- Turbidímetro

5.1.3.4 Cristalería

- Pipetas de 10, 5 y 1 ml.
- Beakers
- Erlenmeyers de 500ml y 1000 ml
- Tubos con tapón de rosca de 15 mL
- Tubos de ensayo sin anticoagulante estériles con tapa de goma

5.2 Metodología

5.2.1 Tamaño de la muestra

Se realizaron hisopados de la cavidad oral de 10 perros que llegaron a campaña de castración masiva.

5.2.2 Toma de la muestra

Justo después de haber inducido a cada paciente en el plano profundo de anestesia, con guantes de látex en las manos se procedió a la toma de muestra con un hisopo estéril, introduciéndolo en las siguientes superficies: boca, frotando carrillos, encías en las caras mesial y lingual, dientes, paladar, sobre y bajo la lengua, con el fin de recolectar suficiente muestra bacteriana.

Cada una de las muestras obtenidas, se depositaron en tubos de ensayo conteniendo medio de transporte Stuart; en dichos tubos ya vienen inmersos los hisopos a utilizar, trasladándolos al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con hielo.

Así mismo, recaudé información sobre la procedencia de cada perro muestreado, ayudado por la cuadro No. 1:

Cuadro No. 1 Información de la procedencia de los perros muestreados para la evaluación del efecto bactericida in vitro del aceite de clavo de olor en cavidad oral de perros

DATOS DEL PACIENTE				
NOMBRE DEL PROPIETARIO	NOMBRE DEL PACIENTE	DOMICILIO	EDAD	ENFERMEDAD PERIODONTAL (SI/ NO)
Germán Bayer	Colt	Z. 2, Guatemala	2 años	No
Emilse Hernández	Molly	Boca del Monte, Guatemala	3 años	No
Oralia Álvarez	Nena	Z. 7, Guatemala	5 años	No
Oralia Álvarez	Toffee	Z. 7, Guatemala	13 años	Si
Gloria Bressani	Bruno	Z. 12, Guatemala	5 años	Si
Xina de Rosales	Fifu	Sn. Lucas, Sacatepéquez	8 años	Si
José Delgado	Colita	Z. 6, Mixco, Guatemala	3 años	No
Virginia Crow	Kaya	Z. 10, Guatemala	12 años	Si
Nicole Gisbert	Chispa	Z. 10, Guatemala	1 ½ años	No
Beatriz Castellanos	Javier	Mixco, Guatemala	6 años	Si

Fuente: Elaboración propia

5.2.3 Procesamiento de la muestra

Los hisopados obtenidos se procesaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Car-

los de Guatemala.

Para el aislamiento bacteriano se sembraron en medios de cultivo Agar sangre, Agar MacConkey y Medio Tioglicolato, después de lo cual, se incubaron estas siembras a 37°C en ambientes de aerobiosis y microaerobiosis, durante 24 - 48 horas, con el fin de aislar y tipificar bacterias, de acuerdo a su ambiente.

De los crecimientos bacterianos obtenidos de las superficies de medios de cultivos se realizaron el estudio macro y microscópico de las colonias. A continuación se efectuaron la identificación bacteriana por medio de pruebas bioquímicas, utilizando caldo Base Fenol Rojo y Manitol (o Lactosa), Agar TSI, Agar de Simmons Citrato, Caldo MRVP, Medio SIM, Agar Urea, Medio Gelatina, Agar en tubo, Agar Sangre, Agar BHI, Agar Macconkey, Agar Rambach, Tioglicolato, pruebas de oxidasa y catalasa, Agar By Parker, Chromocult, Medio Simons Citrato, medio VP.

Las bacterias identificadas se almacenaron en medio de cultivo para su mantenimiento hasta el momento de la evaluación frente al aceite de Clavo de Olor (*Syzygium Aromaticum*).

5.2.4 Obtención del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

El aceite de clavo de olor fue obtenido de la industria farmacéutica “QUINFICA”, ubicada en la colonia el Zapote, Zona 2 de la ciudad de Guatemala.

5.2.5 Preparación del agar, discos y soluciones

Para evaluar el efecto bactericida in vitro del Aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*), se prepararon tres concentraciones de 100, 200 y 300 microgramos por mililitro, en una solución a la que se agregó dimetilsulfoxido y

alcohol al 50%, de los cuales se hicieron pruebas previas (enfrentamiento bacteriano a las sustancias descritas) para constatar que estos solventes no tuvieran actividad bactericida que afectara el estudio de forma directa o indirecta al probar el efecto bactericida del aceite del Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*).

La solución resultante de la unión de las tres sustancias para lograr la concentración deseada del aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*) obedece a la siguiente fórmula de concentraciones que fue sugerida y realizada con apoyo del personal del Lipronat:

Donde:

$$S_{maj} + S_{min} + X = T$$

S_{maj} = Solvente mayor (ml)

S_{min} = Solvente menor (μ l)

X = Elemento a evaluar (mg)

T = Cantidad total a concentración deseada (ml) [μ g/ml]

Las tres soluciones, conteniendo las concentraciones de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), de 10, 20 y 30 μ g/ml, se utilizaron para agregarse en los discos de difusión, a razón de saturación de los de estos de acuerdo al grupo según concentración que se necesitara para el estudio; en el mismo periodo se prepararon los agares y las soluciones que contenían los microorganismos que debían ser sometidos a estudio de acuerdo con el método Kirby-bauer como sigue (Pedrique M. 2002; PEO, 2005).

Se preparó Agar Mueller-Hinton de forma aséptica para verterlas en las distintas cajas de Petri necesarias para cada una de las bacterias a enfrentar.

Se vertió el medio de cultivo en una placa de Petri, dejando solidificar el medio de cultivo, luego fueron secadas las placas durante 30 minutos antes de usarlas para incubación previa.

Se incubaron todas las cajas de Petri conteniendo el Agar Mueller-Hinton durante 24 horas para verificar que estaban libres de contaminación accidental con bacterias ambientales a una temperatura de 37°C; pasado este tiempo se constató que no existe crecimiento bacteriano alguno, por lo que se procedió a la inoculación de los medios con las distintas bacterias a estudiar.

Se inocularon las placas mediante un hisopo estéril utilizando una suspensión de bacteria de 18 a 24 horas de incubación con una turbidez equivalente a 5 puntos de la escala de Mc Farland. Para la inoculación se sumergió un hisopo estéril en el cultivo y se eliminó el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. Se frotó el hisopo sobre toda la superficie del medio de cultivo, repitiendo esta operación tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie.

Se colocó la tapa a cada placa, identificándolas en su base y se dejó secar el inóculo por 3 a 5 minutos.

Se colocaron los discos con las concentraciones antibióticas y de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre el Agar mediante pinzas estériles, oprimiendo los discos suavemente con la pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Los discos se colocaron en espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa fuera de 15 mm y entre ellos de 30 mm aproximadamente.

Se realizó la solución de las concentraciones antibióticas (Enrofloxacin 10%) y de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en el departamento del

Laboratorio de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; la preparación de medios de siembra, cultivos, pruebas bioquímicas, fueron realizados en el Laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, teniendo previamente un entrenamiento de parte del Laboratorio de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en el mismo campus.

Se incubaron las cajas de Petri a 37°C en la incubadora durante 24 horas y cumplido el tiempo se extrajeron dichas cajas para la lectura de los resultados que se obtenidos (PEO, 2005).

5.2.6 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se evaluó la actividad antibacteriana in vitro y la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las tres concentraciones mencionadas de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a los aislamientos bacterianos, obtenidos de los hisopados de la cavidad oral de perros, utilizando las diluciones que se mencionaron anteriormente aplicadas en los discos de difusión, para encontrar la concentración mínima a la que las bacterias son inhibidas incubando las cajas a 37°C por 24 horas. La determinación de la CIM se realizó en el Laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.2.7 Diseño estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y cinco repeticiones cada uno.

5.2.7.1 Análisis estadístico

La variable a medir fue la concentración mínima inhibitoria (C.I.M.) para cada uno de los tratamientos, determinando de acuerdo al cuadro No. 2 si las bacterias aisladas son sensibles o resistentes a estos. Los Tratamientos consistieron en las concentraciones de 10µg, 20µg y 30µg de Aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*), y los resultados se analizaron por medio de la prueba estadística Chi Cuadrado ($\alpha = 0.05$).

Cuadro No. 2 Referencias de referencia para la interpretación de resultados del enfrentamiento bacteriano al aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*) de acuerdo con el método Kirby-bauer

Referencia de Lectura para Interpretación de Resultados	
Referencia	Sigla
RESISTENTE	R
SENSIBLE	S

Fuente: Elaboración propia

El método con el que se trabajó toma como sensible a la bacteria cuyo halo de inhibición sea mayor a 20mm.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resultados

Cuadro No.3 Evaluación del efecto bactericida in vitro del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y Enrofloxacin al 10% en bacterias aisladas en la cavidad oral de perros

Comportamiento bacteriano frente a los tratamientos de aceite de clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>) y Enrofloxacin al 10%													
Bacteria	Acetite de clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>)						Enrofloxacin 10%						Total
	10 µg/ml		20 µg/ml		30 µg/ml		2.5 µg/ml		5 µg/ml		10 µg/ml		
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	
<i>Escherichia coli</i>	0	5	0	5	0	5	5	0	5	0	5	0	30
<i>Proteus mirabilis</i>	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	30
<i>Staphylococcus sp.</i>	0	5	0	5	0	5	5	0	5	0	5	0	30
<i>Streptococcus sp.</i>	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	5	0	30
<i>Neisseria sp.</i>	0	5	0	5	0	5	5	0	5	0	5	0	30
<i>Pasteurella multocida</i>	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	30

Fuente: Elaboración propia

El método con el que se trabajó toma como sensible a la bacteria cuyo halo de inhibición sea mayor a 20mm. "R" resistencia hacia la concentración de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) puesta en el disco. "S" sensibilidad ante la concentración de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a la que se enfrentó.

Cuadro No. 4 Resultados del comportamiento bacteriano individual frente a los tratamientos con aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y Enrofloxacin al 10% sin tomar en cuenta las concentraciones de cada tratamiento

Resultados totales del enfrentamiento bacteriano al aceite de clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>) en concentraciones de 10µg/MI, 20µ/MI Y 30µg/MI y Enrofloxacin al 10% en concentraciones de 2.5µg/MI, 5µg/MI y 30 µg/MI					
Bacteria	Aceite esencial		Enrofloxacin 10%		Totales
	R	S	R	S	
<i>Escherichia coli</i>	15	0	0	15	30
<i>Proteus mirabilis</i>	15	0	15	0	30
<i>Staphylococcus sp.</i>	15	0	0	15	30
<i>Streptococcus sp.</i>	15	0	10	5	30
<i>Neisseria sp.</i>	15	0	0	15	30
<i>Pasteurella multocida</i>	0	15	0	15	30

Fuente: Elaboración propia

El método con el que se trabajó toma como sensible a la bacteria cuyo halo de inhibición sea mayor a 20mm. “R” resistencia hacia la concentración de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) puesta en el disco. “S” sensibilidad ante la concentración de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a la que se el enfrentó.

Cuadro No. 5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), en las tres distintas concentraciones

Concentración mínima inhibitoria del aceite de clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>)				
Número	Bacteria	Concentración	Concentración	Concentración
		10 µg/ml	20 µg/ml	30 µg/ml
1	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R
2	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R
3	<i>Staphylococcus sp.</i>	R	R	R
4	<i>Streptococcus sp.</i>	R	R	R
5	<i>Neisseria sp.</i>	R	R	R
6	<i>Pasteurella multocida</i>	S	S	S

Fuente: Elaboración propia

El método con el que se trabajó toma como sensible a la bacteria cuyo halo de inhibición sea mayor a 20mm. CIM para *Pasteurella multocida* = 10 µg/ml. “R” resistencia hacia la concentración de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) puesta en el disco. “S” sensibilidad ante la concentración de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a la que se enfrentó.

6.2 Discusión de resultados

En este estudio se quiso comprobar el efecto bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a través del método de difusión en Agar o método Kirby-bauer y la concentración mínima inhibitoria (CIM) a la que se puede utilizar dicho aceite.

La comprobación bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) consistió en demostrar la inhibición del crecimiento de bacterias aisladas, en condiciones estándar, con la presencia del aceite en cuestión, comprobándolo con un antibiótico de amplio espectro como las quinolonas, siendo en este caso la Enrofloxacin al 10%, para tener un valor de referencia (grupo control).

La concentración mínima inhibitoria (100, 200 y 300 µg/ml), consistió en encontrar la concentración menor en la que el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), fue capaz de impedir el crecimiento bacteriano de forma visible en el medio de cultivo.

Se evidenció que *Pasteurella multocida* fue la única bacteria susceptible a las distintas concentraciones del aceite de clavo de olor en un 100 %, siendo los halos de inhibición mayores a los 20 mm de diámetro, medida que establece el método Kirby-bauer como parámetro de validez; quedando excluidos los halos de

inhibición muy cercanos a esa cifra. (PEO No 9, 2005). (Cuadro No. 3; Cuadro No. 4)

Son Cáceres, A. 1996, EOP,___ y Herrera F, García R. 2006 quienes reportan que el aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*) contiene eugenol que es su principio activo y que está presente en el aceite en un 99%. El eugenol es el compuesto fenólico al que se le atribuye la actividad antimicrobiana y antifúngica, mencionando su efectividad sobre *S. aureus*, *E.coli* y *C. albicans*. (Cáceres, A. 1996; Herrera F, García R. 2006).

Lo anterior explica el efecto bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a *Pasteurella multocida*, que es un habitante normal de la flora bucal de perros y gatos y que es sensible a los fenoles (EOP,___; Martínez, M.A, 2005; de Cueto, M. Pascual, A. ____; Ecured, ____)

En el caso de *Escherichia Coli* y *Proteus mirabilis*, mostraron resistencia marcada frente al aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), puesto que no se obtuvo actividad bactericida en ninguna de las concentraciones evaluadas, por lo que se interpreta que el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no presentó, en este estudio, actividad bactericida para las dos bacterias. (Cuadro No. 3; Cuadro No. 4)

La razón por la que el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no tuvo efectividad sobre *Escherichia Coli* no se tiene muy clara, esto obedece a que son varias las causas por las que el aceite pudo no haber sido efectivo. Entre estas causas se mencionan la presencia de ácidos grasos libres en la lecitina a los que esta bacteria aprovecha para proveerse de protección contra los compuesto fenólicos, estos ácidos grasos libres los pudo obtener en el ambiente bucal por alimentos en los que están presentes dichos ácidos, o en los medios de crecimiento bacteriano, actuando los compuestos fenólicos a bajas

concentraciones cuando se enfrentan a dicha bacteria (S. Burt, R. Reinders, 2003).

La segunda teoría la propone J. Sánchez. 2008, quien comprobó que el uso prolongado y sin control médico de los antibióticos fue una de las causas de la resistencia de *Escherichia coli* frente a los antibióticos. Con lo anterior se pretende ilustrar, que esta bacteria se ha venido haciendo más fuerte debido al uso de antibióticos de forma prolongada y sin control médico, aunque se desconocen los records clínicos de los pacientes sometidos al presente estudio.

Generalmente, los aceites esenciales que poseen elevada actividad antibacteriana frente a patógenos resistentes, concentran su acción en distintos componentes del aceite esencial sobre la célula, estos componentes llamados compuestos fenólicos como carvacrol, eugenol y timol en altas concentraciones, son los responsables de dicha actividad antibacteriana.

Una de las características más importante de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, esto hace que sean capaces de penetrar a través de las membranas celulares, alterando sus estructuras y haciéndolas más permeables en presencia de los compuestos fenólicos en altas concentraciones, provocando la pérdida excesiva o salida de moléculas críticas y causando por ende la muerte celular (Cáceres, A. 1996; EOP,___)

EOP.___, menciona que los compuestos fenólicos son quienes poseen la actividad bactericida, sin embargo también sostienen que los compuestos fenólicos propios de cada una de las plantas, y que poseen la actividad bactericida, carecen de efectividad ante ciertas bacterias, porque estas no son sensibles a dichos compuestos, tomando en cuenta que generalmente estas bacterias son gram negativas, poseyendo estas una doble capa lipídica que impide la penetración de los cuerpos fenólicos.

Aunque para algunos estudios *Proteus mirabilis* muestra sensibilidad ante los compuestos fenólicos propios de aceites esenciales y extractos de plantas incluyendo al aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) (Zampini, I. et al 2007; Saeed, S. Tariq, P. 2008), para este estudio no se encontró actividad bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a esta cepa bacteriana, esto puede obedecer a que las concentraciones utilizadas no fueron lo suficientemente altas como para causar sensibilidad en la bacteria en cuestión. Las concentraciones de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), que Saeed, S. y Tariq, P. (2008) utilizaron en su estudio no aparecen especificadas, mientras que Zampini, I. et al (2007) describen que las concentraciones obedecen un rango de 25 a 50 µg de extracto de las plantas *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, y *S. aphylla*.

Mientras tanto, *Staphylococcus sp.* y *Neisseria sp.* son bacterias muy particulares, pues al enfrentar las cepas a las distintas concentraciones de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), se obtuvieron halos mayores de 10 mm pero menores o iguales a 20 mm de diámetro; lo que indicó que el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) presentó un efecto bactericida bajo, debido a que el método Kirby-bauer solo toma como sensibles a las bacterias que hayan mostrado un halo de inhibición mayor a 20 mm de diámetro, por lo que se recomendaría aumentar las concentraciones de aceite esencial para evaluar este efecto. (cuadro No. 3; cuadro No.4)

Estas cepas bacterianas, que se encuentran de manera común en boca de perro y gato (Cadima, M. Calderon Ma. 2011; Martinez, Ma. 2005), demuestran ser sensibles ante la presencia del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) debido a que, en el caso particular de *Staphylococcus sp.*, los compuestos fenólicos (eugenol) de este aceite, que además han demostrado ser no solo bactericidas sino antifúngicos, pueden vencer la pared bacteriana, pasar a citoplasma y adherirse a las proteínas para destruirlas, causando la muerte de la

célula. Lo anterior cobra mayor importancia al combinarse con otros aceites esenciales que potencian su efecto (Bassolé, I. Juliani, R. 2012; Cortez, D. Fernandez Cla. Pereira, W. 2014; Cáceres, A. 1996).

Por otro lado, la Agencia de Salud Pública de Canadá (2011) y Paz, M. (2011) reportan que *Neisseria sp.* es una bacteria que muestra alta sensibilidad a agentes fisicoquímicos, como el calor, la desecación, desinfectantes y cuerpos fenólicos; por lo que siendo el eugenol un compuesto fenólico contenido en el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), este tiene la propiedad de ser efectivo contra *Neisseria sp.* aunque en este estudio no se pudo comprobar en las concentraciones evaluadas y tampoco se encontraron valores para las CIM del aceite esencial tanto para *Staphylococcus sp.* como para *Neisseria sp.* en la bibliografía consultada.

Evaluando *Streptococcus sp.* se observó que, el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no inhibió del todo al crecimiento de esta bacteria, dando como resultado halos menores a 15 mm y mayores a 5 mm de diámetro, con lo que se concluye que el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no tiene acción bactericida significativa, según el método Kirby-bauer (PEO No. 9, 2005). (Cuadro No. 3; Cuadro No. 4)

Xu, J. et al (2013) al realizar un estudio sobre el efecto de eugenol sobre *Streptococcus mutans* y la evolución de efectos cariogénicos en ratas, sostienen que dicho compuesto fenólico contenido en gran cantidad del aceite de clavo de olor (Cáceres, A. 1996; EOP,___), demostró ser efectivo contra *Streptococcus mutans*, quien es responsable de las lesiones cariogénicas al inhibir la adhesión a la superficie dentaria y la producción de ácidos orgánicos que provocan la desmineralización dentaria en grado significativo; la concentración utilizada en ese estudio fueron de 4 a 16 mg/ml.

Mientras tanto Gupta, C. et al (2011) sostienen a través del estudio que realizaron enfrentando los aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y Canela (*Cinnamomum zeylanicum*), en volúmenes de 50 µl de cada uno, a bacterias Gram positivas y Gram negativas provenientes de la microbiota bucal humana, que la efectividad de los compuestos fenólicos del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y la clorhexidina es mucho menor en comparación a la obtenida al aceite de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), al interactuar con *Streptococcus mutans*, dando halos de inhibición parecidos a los obtenidos en este estudio, con lo que explican que es posible ser más efectivo el aceite de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) debido al cinnamaldehído contenido en ella, que es un aldehído aromático que inhibe la actividad aminoácido descarboxilasa, que además tiene un potente efecto bactericida.

Al enfrentar las bacterias, que fueron resultado de las siembras de los hisopados de boca de perros contra las distintas concentraciones de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), se determinó que la CIM para *Pasteurella multocida* a través del método Kirby-bauer fue de 10 µg/ml. (Cuadro No. 5; Cuadro No.7)

Por el contrario, los halos de inhibición que mostraron *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* y *Streptococcus sp.* fueron iguales o menores a 20 mm, por lo tanto, a través del método Kirby-bauer, el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no tiene actividad bactericida sobre ellas. (Cuadro No. 3; Cuadro No. 4)

En la prueba estadística de Chi², al analizar los tratamientos del grupo control (Enrofloxacina 10%) versus aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), se evidenció la existencia de una diferencia significativa entre los tratamientos (p= 0.0005), que denota que las concentraciones del aceite esencial, evaluado en este estudio, no presenta efecto bactericida contra el espectro bacteriano aislado

de las bocas de los distintos pacientes caninos, a los que se les practicó el hisopado bucal para realizar el aislamiento bacteriano.

La razón por la que Enrofloxacin al 10% tiene efecto bactericida sobre la mayoría de bacterias obedece a que es una quinolona de amplio espectro que inhibe la síntesis de ADN bacteriano, inhibiendo específicamente de forma irreversible, la enzima ADN-girasa, responsable de una serie de funciones vitales para la bacteria. (Ruminal.____) (Cuadro No.3; Cuadro No. 4)

Así mismo, se realizó la prueba χ^2 únicamente para los resultados del enfrentamiento bacteriano al aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), haciendo dos grupos generales: resistentes y sensibles, determinando que no existe diferencia significativa ($p= 0.8869$) para las concentraciones de aceite esencial evaluadas en este estudio; por lo tanto, esto expone que ninguna de las concentraciones posee efecto bactericida para el espectro bacteriano aislado.

Es importante mencionar que según la recopilación de los datos obtenidos (Cuadro No 3; Cuadro No. 4; Cuadro No. 5) en este estudio, se demuestra que *Pasteurella multocida* es la única bacteria que, de acuerdo con el método Kirby-bauer, mostró sensibilidad al enfrentarla al aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en las distintas concentraciones de aceite esencial, obteniéndose una CIM de 10 $\mu\text{g/ml}$; siendo esta bacteria parte de la flora normal de la cavidad oral de perros y gatos, y es quien promueve la colonización de otros microorganismos gracias a sus propiedades adhesivas como la lectina. (EOP. ____; Martínez, M.A, 2005; de Cueto, M. Pascual, A. ____; Ecured. ____; Carrillo, M. ____)

En este estudio el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no demostró un efecto bactericida en las concentraciones utilizadas contra las bacterias restantes que fueron aisladas de la cavidad oral de perros (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* y *Streptococcus sp.*).

VII. CONCLUSIONES

- El aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no fue efectivo, en las distintas concentraciones (10µg/ml, 20µg/ml y 30µg/ml), contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* y *Streptococcus sp.*
- La única bacteria sensible al efecto bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en las concentraciones evaluadas (10µg/ml, 20µg/ml y 30µg/ml) fue *Pasteurella multocida*.
- La CIM del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) obtenida para el control sobre *Pasteurella multocida* fue de 10µg/ ml.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar otro estudio *in vitro* para evaluar el efecto bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en concentraciones mayores en bacterias comúnmente aisladas en cavidad oral de perro.
- Evaluar el efecto bactericida *in vitro* del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en combinación con otros aceites esenciales para evaluar la sensibilidad de los microorganismos aislados en este estudio de la cavidad oral de perros.
- Evaluar el efecto bactericida *in vitro* del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en otras bacterias aisladas en la cavidad oral de perros.
- Evaluar el efecto bactericida *in vivo* del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) como tratamiento preventivo del apareamiento de la enfermedad periodontal en perros.
- Al utilizar concentraciones más altas de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) para impregnar los discos de difusión, utilizar cajas de Petri de vidrio, ya que las plásticas se dañan.

IX. RESUMEN

El propósito de este estudio fue comprobar el efecto bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre las bacterias comúnmente aisladas de la cavidad oral en 10 perros que llegaron a jornadas de castración.

Se realizaron hisopados de la cavidad bucal para realizar el aislamiento bacteriano, se sembraron en medios de cultivo Agar sangre, Agar Mcconkey y Medio Tioglicolato; con la finalidad de identificar, seleccionar y purificar las colonias bacterianas más comunes y evaluar el efecto bactericida.

De los hisopados bucales se aislaron con mayor frecuencia las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* y *Streptococcus sp.* y *Pasteurella multocida*. Utilizando el método de discos de difusión, se determinó que el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no fue efectivo contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* y *Streptococcus sp.* en las distintas concentraciones de 10µg/ml, 20µg/ml y 30µg/ml. La única bacteria sensible al efecto bactericida del aceite de Clavo de Olor en las concentraciones evaluadas (10µg/ml, 20µg/ml y 30µg/ml) fue *Pasteurella multocida*. La actividad antimicrobiana del aceite esencial se atribuye al eugenol, compuesto fenólico que en altas concentraciones, tiene la capacidad de degenerar las proteínas bacterianas.

Se determinó que la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) obtenida para el control sobre *Pasteurella multocida* fue de 10µg/ml.

SUMMARY

The purpose of this investigation was to prove the bactericidal effect of clove (*Syzygium aromaticum*) against commonly isolated bacteria in 10 dogs' oral cavity which went to spay campaigns.

There were made buccal swaps to do bacterial isolates, after that, those swaps were made sow in Blood agar, Mcconkey agar, and Thioglycolate breeding grounds, in order to identify, select and purify the most commonly bacteria colonies and evaluate the bactericidal effect.

From buccal swaps were isolated with more frequency these following bacteria: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* y *Streptococcus sp.* y *Pasteurella multocida*. Through the Kirby-Bauer method, this investigation concludes clove oil (*Syzygium aromaticum*) wasn't effective against *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* and *Streptococcus sp.* in the different concentrations tried (10µg/ml, 20µg/ml and 30µg/ml). Just *Pasteurella multocida* is the one which was sensible to bactericidal effect of Clove oil (*Syzygium aromaticum*) in its all evaluated concentrations (10µg/ml, 20µg/ml y 30µg/ml). The essential oil's antimicrobial activity is because of eugenol, which is an phenolic compound that can degenerate bacterial proteins in high concentrations.

A Minimun Inhibitory Concentration (M.I.C.) of Clove oil (*Syzygium aromaticum*) was obtained to control *Pasteurella multocida*, and this M.I.C. was 10µg/ ml.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, D. 1988. Anatomía Canina. Porción Rostral. España. Editorial Acribia, S.A.. p. 269
2. Alvarado, E. 2001. Evaluación in vitro de la microfiltración de cuatro materiales obturadores temporales: Óxido de Zinc y Eugenol, Temrex, Cavit y Coltosol, previo a la obturación endodoncica de los conductos radiculares. Guatemala. Tesis Lic. Odontología/USAC. p. 85.
3. Ardila, M. et al. 2009. Actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanu vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. Colombia, ensayo. p. 57
4. Barrera, L. García, L. 2008. Actividad Antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de papaya (*Carica papaya*). PDF (en línea). Consultado el 8 de may. de 2011. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08005>.
5. Bassolé, I; Juliani, R. 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. Burkina Faso. PDF. (en línea). Consultado el 8 de sep. de 2013. Disponible en: www.mdpi.com/14203049/17/4/3989/pdf
6. Beer, E; Wright, W. 1932. The inorganic composition of the parotid saliva of the dog and its relation to the composition of the serum. USA. Artículo científico. PDF (en línea). Consultado el 16 de ago. de 2011. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/95/2/671.full.pdf>

7. Burt, S; Reinders, R. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. _____. Artículo científico. (en línea). Consultado el 1 de ago. de 2014. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x/full>
8. Cáceres, A. 1,996. Plantas De Uso Medicinal en Guatemala. Clavo. Editorial Universitaria: Guatemala. p. 402
9. Cadima, M; Calderón, Ma. 2011. Gérmenes más comunes identiicados en las heridas por mordeduras, sensibilidad y resistencia a los antibióticos. Bolibia. PDF. (en línea). Consultado el 2 de sep. de 2013. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S101229662011000200005&script=sci_arttext
10. Cortez, D; Fernández, Cla; Pereira, W. 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. Brasil. Articulo informativo. PDF. (en línea). Consultado el 8 de sep. de 2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819475/>
11. Chávez, J. 2010. Actividad antimicrobiana *in vitro* de seis plantas de uso medicinal sobre las principales cepas de bacterias y hongos que afectan piel y oído en perros. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala, GT USAC/FMVZ. p. 23
12. De Cueto, M, Pascual, A. s.f. Pasteurella multocida. PDF. España. (en línea). Visto el 12 de nov. de 2013. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/ccsrevisionestematicas/bacteriologia/pmultocida.pdf>
13. Enciclopedia Cubana. s.f. Pasteurella. Documento informativo. Cuba. (en línea). Visto el 14 de ago. de 2014. Disponible en: <http://www.ecured.cu/index.php/Pasteurella>.

14. Esencial Oils Perú. s.f. Aceites esenciales en la industria alimentaria. PDF. Perú. (en línea). Consultado el: 20 de feb. de 2014. Disponible en: http://www.aceitesesenciales.com/es/pdf/aceites_escenciales_en_la_industria_alimentaria.pdf
15. Ettinger, S. Feldman E. 2002. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del Perro y Gato. Argentina. Vol II. Tomo V. 5 edición. Editorial Iner-Mpedica. P. 2274.
16. Garcia, R. 2002. Eugenol: Propiedades Farmacológicas y Toxicológicas. Ventajas y Desventajas de su uso. Revisión. Centro de Información Farmacéutica. Cuba. (en línea). Consultado el 15 mar. de 2011. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-7507200200020005&script=sci_arttext
17. Guerrero, D. 2008. Determinación de los niveles de inserción periodontal luego de la aplicación de Clorhexidina en gel al 0.2% en el surco gingival de perros con periodontitis. Guatemala. Tesis. (en línea). Consultado el 23 de jul. de 2011. Disponible en: https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:F9Mnk8MEqnEJ:biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1142.pdf+determinacion+de+los+niveles+de+insercion+periodontal&hl=es419&gl=gt&pid=bl&srcid=ADGEEShhG0aqXJQt0yXqhji8BI0tf7daAAPWHFsjWhvZWay7AuKA8nuaih9G1IOWpncx5Nvltzmx2d0hUnEch6SXQeHQSciEm0RU86kCBU8o4G3urYoEt8geBvXkrCsTpFCVirqrZ2&sig=AHIEtbSvPHvQbJZPNFCjtfHSPqTyLS-zrg.
18. González, R. 2002. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. Cuba. Revisión de literatura. (en línea). Consultado el 10 de jul. de 2011. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475072002000200005&script=sci_arttext

19. Gupta, C. et al. 2011. Comparative study of cinnamon oil & clove oil on some oral microbiota. Artículo científico. India. (en línea). Consultado el 29 de ene. de 2014. Disponible en: <http://pharmacologyonline.silae.it/files/newsletter/2011/vol2/006.guptarevised.pdf>
20. Sanchez, J. 2008. Evolución de la resistencia a antibióticos de escherichia coli en muestras de orina procedentes de la comunidad. Revision de literatura. PDF. (en línea). Consultado el 21 de jul. de 2014. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/urol/v61n7/02.pdf>
21. Karring, L. 2008. Periodonotología Clínica e Implantología Odontológica. Editorial Médica Panamericana, S.A. España. p. 570.
22. Krauss, J. 2011. Enfermedad Periodontal. Endodoncia. Argentina. PPT.
23. Lobprise, H. 2009. Odontología de Pequeños Animales. Problemas Orales/ dentales adquiridos: problemas periodontales. Argentina. Intermédica. p.374.
24. Martinez, Ma. 2005. Microorganismos asociados a infecciones por mordeduras de perros y gatos. Monografía. Chile. PDF. (en línea). Consultado el 2 de sep. de 2013. Disponible en: <http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPA.VET1-2005/PDF/MEPAVET07.pdf>
25. Movis, H. 1960. Investigación sobre la flora bacteriana de la boca del perro. Consideraciones críticas. Venezuela. Revista Núm. 6. (en línea). Consultado el 20 de mar. de 2011. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/??IsisScript=AGRINVE.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=007233>

26. Nakata, H. 2004 Baterias Orales y Enfermedades Sistémicas. Revisión. Universidad Mayor de San Marcos: Perú. (en línea). Consultado el 25 de mar. de 2011. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2004_n1/a07.htm
27. Negroni, M. 2009. Microbiología Estomatológica, Fundamentos y guía práctica. Microbiología de las enfermedades gíngivoperiodontal, de la periimplantitis, de los conductos radiculares y de los procesos perirradiculares (primera parte). Ed. Panamericana. Argentina. p. 639.
28. Nelson, R; Cuoto, G. 1999. Manual of Small Animal Internal Medicine. Gingivitis/Periodontitis. USA. Mosby edit. P. 894
29. Newman, M. et al 2010. Periodontología Clínica. México. Ed. McGraw Hill. 10 edición . p. 1085.
30. Paz, M. 2011. Cocos Gram Negativo *Neisseria* spp & *Moraxella* sp.____. PPT. (en línea). Consultado el 19 de oct. de 2013. Disponible en: <http://microinmuno.files.wordpress.com/2011/02/c-7-cocos-gram-negativo>. Ppt
31. Piqueras, M. 2001. Quorum sensing. Ficha informativa. España. (en línea). Consultado el 10 de oct. de 2011. Disponible en: http://medtrad.org/panacea/IndiceGeneral/n6_Fichas1.pdf
32. Public Health Agency of Canada. 2011. *Neisseria* spp. Canadá. (en línea). Consultado el 19 de oct. de 2013. Disponible en: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/neisseria-eng.php>
33. Riera, L. 2006. Animales libres de patógenos específicos. Cuba. (en línea). Consultado el 23 de sep. De 2011. Disponible en: <http://www.Monografías.com>

/trabajos42/animales-de-laboratorio/animales-de-laborato-rio2.shtml

34. Ross, P; Habrook, P. 1987. Microbiología bucal y clínica. México. Editorial Científica. p. 182.
35. Ruminant.sf. QUINOLONAS. Argentina. PDF. Ficha informativa. (en línea). Consultado el 22 de ene. de 2014. Disponible en: <http://www.ruminant.com/ar/sites/default/files/Enrofloxacin%20m%C3%A1s%20informaci%C3%B3n.pdf>
36. Saeed, S; Tariq, P. 2008. In vitro antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. Pakistan. Artículo científico. PDF. (en línea) Consultado el 20 de mar. de 2014. Disponible en: [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40\(5\)/PJB40\(5\)2157.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40(5)/PJB40(5)2157.pdf)
37. Swenson, M; Reece, W. 1999. Fisiología de los animales domésticos de Dukes. México. Tomo I. Noriega Editores. Edic. V. p. 925.
38. Tizard, I. 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. España. Libro. Pg 574. (en línea). Consultado el 28 de oct. de 2011. Disponible en: http://books.google.com.gt/books?id=9ksTjFYwKtC&pg=PA241&lpg=PA241&dq=lisozima,+lactoperoxidasa+y+lactoferrina*veterinaria&source=bl&ots=pmvuVvOxqz&sig=C9c8tjeMzHNzBW9wlnCMRPWtkbw&hl=es-419&ei=mMWXTpraL6Pn0QGB97nBBA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false
39. XU, J. et al. 2013. The effect of eugenol on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and dental caries development in rats. Artículo científico. USA. (en línea). Consultado el 26 de ene. de 2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3702691/>

40. Zampini, I. et al. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Argentina. Artículo científico. PDF. (en línea). Consultado el 20 de mar. de 2014. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-2957200700030001

XI. ANEXOS

Anexo No. 1

PEO No.9 Actividad Anti-*Campylobacter jejuni*



LABORATORIO DE BIOENSAYOS
DEPARTAMENTO DE CITO HISTOLOGÍA
Actividad Anti-*Campylobacter jejuni* 1/6
PEO No 9 Febrero 2005



TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTI-*Campylobacter jejuni*

Elaborado por:	Lic. Cristian Alvarez	Fecha: Marzo 2005
Revisado por:	Carmen Ozaeta	Fecha: Octubre 2007
Autorizado por:	Licda. Margarita Paz	Fecha:

I. DEFINICIÓN

El género *Campylobacter* comprende un grupo de bacilos Gram negativo, helicoidalmente curvados y delgados, no esporuladores y poseen uno o dos flagelos polares que le confieren movilidad; miden de 0.2 a 0.5 μm de ancho y de 0.5 a 5 μm de longitud. Se han informado diversas morfologías, entre ellas formas en espiral, en S, en ala de gaviota, de coma y cocoide, siendo la forma cocoide la que se observa con mayor frecuencia después del aislamiento en el laboratorio.

C. jejuni se encuentra en todo el mundo como comensales en el tracto intestinal de animales de sangre caliente. Se transmite al ser humano a través de alimentos crudos o poco cocidos o tras el contacto directo con animales infectados. La enteritis es la forma más frecuente de diarrea bacteriana aguda en países desarrollados pero, en países en vías de desarrollo se considera la segunda o tercera causa de la diarrea infantil. La confirmación del diagnóstico de la infección por *Campylobacter* se basa en el aislamiento de la bacteria en los cultivos de heces, sangre u otra localización.

II. OBJETIVO

Proporcionar instrucciones para determinar la actividad anti-*C. jejuni in vitro*

III. RESPONSABLE

Es responsabilidad de la persona designada el cumplimiento de este PEO, que debe ser ejecutado de forma correcta para determinar la actividad anti-*Campylobacter jejuni in vitro* de los extractos a ensayar

IV. DISTRIBUCIÓN

Auxiliar de laboratorio o estudiantes

V. MATERIALES Y EQUIPO

- α -naftilamida

Fuente: Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología



LABORATORIO DE BIOENSAYOS
DEPARTAMENTO DE CITO HISTOLOGÍA
Actividad Anti-*Campylobacter jejuni* 2/6
PEO No 9 Febrero 2005



- Ácido sulfanílico
- Agua destilada
- Algodón
- Asas de nicromo en argolla
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cajas de Petri simples
- Caldo nitrado
- Caldo tripticasa soya
- Caldo tripticasa soya y glicerol al 15%
- Campana bacteriológica
- Campana de flujo laminar
- Centrifuga
- Cinta adhesiva
- Cinta testigo
- Colorantes de Gram (cristal violeta, alcohol-acetona, lugol, carbol fucsina)
- Congelador a -80°C .
- Discos de ácido nalidíxico (30 μg)
- Discos de cefalotina (30 μg)
- Discos de eritromicina (30 μg)
- Discos estériles
- Espátulas
- Estándar de MacFarland 0.5
- Etanol al 50%
- Etanol al 95%
- Gradilla
- Guantes
- Hipurato de sodio
- Hisopos
- Incubadoras a 36 y 42 $^{\circ}\text{C}$.
- Jarra Gas-Pak
- Láminas cubreobjetos
- Láminas portaobjetos
- Marcador indeleble
- Mechero Bunsen
- Medio de cultivo Columbia (OxoidTM)
- Membranas de nitrato de celulosa con 45 μm de diámetro
- Microscopio de luz blanca
- Ninhidrina
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Pinzas
- Pipetas automáticas de 10 a 100 μL y de 100 a 1000 μL
- Reactivo de oxidasa
- Refrigerador a 4 $^{\circ}\text{C}$
- Sangre de carnero

Fuente: Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Cito histología



**LABORATORIO DE BIOENSAYOS
DEPARTAMENTO DE CITOHISTOLOGÍA
Actividad Anti-*Campylobacter jejuni* 3/6
PEO No 9 Febrero 2005**



- Sobres para crear sistema microaerofílico (Campy-pak BBL™).
- Solución de eritromicina.
- Solución salina al 0.85%
- Sonificador
- Tubos pequeños con tapón de rosca estériles
- Viales
- Vortex

VI. PROCEDIMIENTO

Transporte

Las muestras de heces se deben de transportar en medio Cary-Blair. Requiere de una atmósfera microaerofílica (5% de O₂, 10% de CO₂, y 85% de N₂) para lograr una recuperación óptima.

Filtración por membrana

Es utilizada para el aislamiento de las especies de *Campylobacter* a partir de muestras clínicas; se basa en la capacidad que poseen estos microorganismos de pasar con relativa facilidad, a través de una membrana de nitrato de celulosa con un poro de 0.45 a 0.65 µm de diámetro, mientras que el resto de la microbiota intestinal competitiva queda retenida en la superficie del filtro.

Consiste en la colocación de un filtro de membrana estéril sobre la superficie del medio. Una vez colocado el filtro estéril sobre el medio, se procede a colocar 10 a 15 gotas de una suspensión de la muestra, incubando a 42 °C en condiciones microaerofílicas por una hora. El filtro es removido pasado este tiempo y las placas se incuban nuevamente bajo las mismas condiciones por 48 horas más.

Aislamiento

El aislamiento de *C. jejuni* a partir de muestras clínicas, requiere la incubación de las placas primarias a una temperatura de 42 a 43 °C; (la incubación a temperaturas más elevadas suprimen la microbiota intestinal normal competitiva y permiten la proliferación de bacterias termófilas, simplificando así la identificación de *C. jejuni*) aunque *C. jejuni* crece bien entre 36 a 37 °C.

Las colonias se desarrollan totalmente en 24 a 48 horas; dependiendo del medio utilizado; son incoloras o grises, acuosas y extenderse o redondas y convexas, y ambos tipos de colonias pueden aparecer sobre las placas de agar. No se observa ningún tipo de hemólisis en el medio.



LABORATORIO DE BIOENSAYOS
DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA
Actividad Anti-*Campylobacter jejuni* 4/6
PEO No 9 Febrero 2005



Figura 1. Colonia de *Campylobacter jejuni* en agar sangre.

Identificación

Tinción de Gram: se observan bacilos Gram negativo con forma de coma, S o "ala de gaviota", las cuales son las morfologías típicas de este microorganismo.

Pruebas bioquímicas: es oxidasa y catalasa positivo y no oxida ni fermenta los carbohidratos. Para la identificación pueden emplearse reducción del nitrato, producción de sulfuro de hidrógeno, hidrólisis del hipurato y susceptibilidad al ácido nalidíxico y a la cefalotina que presentan las diferentes especies del género *Campylobacter*.

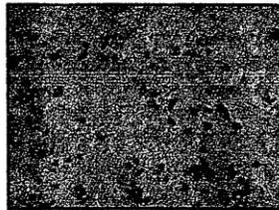


Figura 2. Gram de *C. jejuni*.
Bacilos Gram negativo con forma de coma, S o "ala de gaviota"

Resiembras de *Campylobacter jejuni* cepa ATCC 33291 y aislamientos clínicos

- Realizar resiembras en medio de cultivo Columbia-agar sangre al 7.5%: Tomar los viales que contiene la bacteria, los cuales se encuentran almacenados en el congelador de -80°C , con el asa bien caliente, tomar la muestra, de preferencia que sea hielo, hacer un inóculo inicial, y luego hacer 4 estriados perpendiculares al inóculo inicial.
- Incubar a 36°C por 48 horas. Observar colonias mucoides, planas y extendidas sobre la superficie del medio (efecto de swarming), o colonias pequeñas, de color blanco grisáceo, en forma de gotas de rocío.
- Comprobar la identidad de las colonias por tinción de Gram, prueba de oxidasa, prueba de catalasa e hidrólisis de hipurato.
- Almacenar nuevamente en viales con tripticasa soya y glicerol al 15%, hasta el momento de realizar el ensayo de actividad antimicrobiana.



Aislamientos clínicos de *Campylobacter jejuni*.

Para su aislamiento realizarlo por medio del método de filtración por membrana, que de acuerdo a González es el más indicado.

- Suspender 1 gramo de heces en 20 mL de solución salina.
- Agitar vigorosamente y centrifugar.
- Agregar de 4 a 5 mL. del sobrenadante en la membrana de nitrato de celulosa con filtro de 45 μm , que se coloca en la superficie del medio Columbia enriquecido con 7.5% de sangre de carnero.
- Incubarlo a 42°C en una atmósfera microaerofílica con aproximadamente 85% de nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno durante 48 horas.
- Buscar en el medio de cultivo colonias no hemolíticas que pudieran presentar las siguientes morfología: mucoides, planas y extendidas sobre la superficie del medio (efecto de swarming), blanco-grisáceas.
- Realizar las pruebas de identificación respectivas para *C. jejuni*, tales como Tinción de Gram, prueba de oxidasa, prueba de catalasa, hidrólisis del hipurato, susceptibilidad al ácido nalidixico, susceptibilidad a la cefalotina.

Ensayo de actividad contra *Campylobacter jejuni*, por extractos de plantas

Preparación de dilución del extracto a concentración conocida (1mg/mL)

- Se debe pesar 1 mg de los extractos a evaluar y disolverlo en 1 ml de etanol al 50%, colocándolo en viales debidamente limpios. (se debe disolver bien el extracto en el disolvente, si no se ha disuelto con el vortex, se debe de sonicar).

Impregnación de discos de difusión con el extracto

- Impregnar con 50 μL de cada extracto en una concentración de 1 mg/mL, bajo la campana de flujo laminar. (De preferencia impregnar 10 μL diarios, ya que es la cantidad que se absorbe bien en el disco).

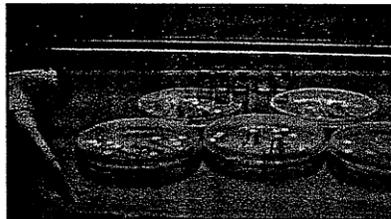


Figura 3. Impregnación de discos



LABORATORIO DE BIOENSAYOS
DEPARTAMENTO DE CITOHISTOLOGÍA
Actividad Anti-*Campylobacter jejuni* 6/6
PEO No 9 Febrero 2005



Inóculo de microorganismos

- Tomar de 3 a 5 colonias de *C. jejuni* en un tubo con 1 mL de caldo tripticasa soya.
- Incubar a 36°C por 30 minutos, verificando que la turbidez sea aproximadamente igual al estándar de McFarland. Si no se ha alcanzado la turbidez, dejar incubar más tiempo. Si la turbidez es mayor, diluirlo con caldo de cultivo hasta igualar al tubo estándar. Al alcanzar la turbidez deseada: Inocular con un hisopo estéril en cuatro direcciones sobre la caja de agar sangre.
- Antes de 15 minutos y no menos de 5, cuando el medio ya absorbió la carga microbiana, colocar un máximo de 6 discos con los extractos por caja, incluir en cada caja un disco de ácido nalidíxico, cefalotina o eritromicina de 30 µg como control positivo y/o un disco impregnado únicamente con etanol, como control negativo.

Interpretación de resultados

- Un halo de inhibición de crecimiento (>20 mm), comparando con el diámetro de inhibición del disco de ácido nalidíxico: extracto activo. Ausencia de inhibición de crecimiento: Extracto inactivo.

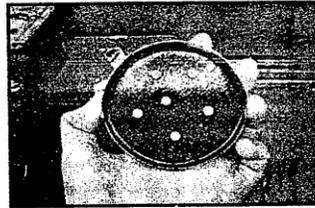


Figura 4. Ensayo anti-*Campylobacter*

Método Bauer Kirby, utilizado para el bioensayo, no se observa ningún halo de inhibición, de los discos con extracto, únicamente el control positivo al centro de la placa.

VII. BIBLIOGRAFÍA:

- Torres M. Manual práctico de bacteriología médica. Guatemala: Editorial Serviprensa C.A., 1999. 223pp.
- Tech Doc: Identification of *Campylobacter* species, Issue No. 1. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, Specialist and Reference Microbiology Division, Reference no: BSOP ID 23, SOP from Health Protection Agency.
- Tech Doc: SOP for detection of *Campylobacter jejuni* in stool samples. INCAP-NS-NL BD-003-2, approved by Burgeois AL, O Torres & R. Pratdesaba, 1999; 10 pp.
- Paz AM. Búsqueda de actividad contra especies de *Campylobacter* en plantas nativas de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis maestría multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Facultad de Agronomía) 2005. 60p

Procedimiento para el aislamiento bacteriano, identificación y enfrentamiento al aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*)

Figura No. 1 Siembra de hisopados en Agar Sangre y verificación del crecimiento bacteriano después de 24 horas de incubación



Fuente: Elaboración propia

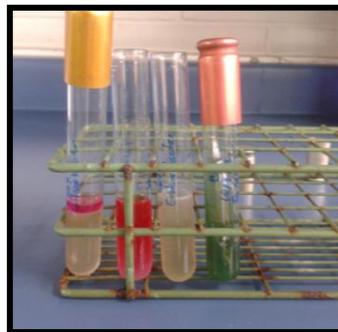


Fuente: Elaboración propia

Figura No. 2 Selección de bacterias e identificación de acuerdo a bioquímicas, tinciones y siembras



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

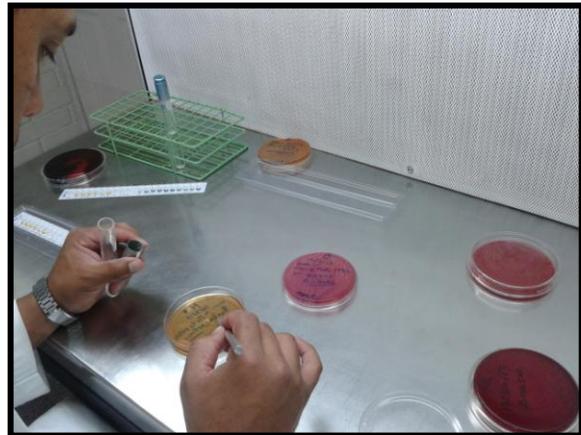


Fuente: Elaboración propia

Figura No. 3 Purificación de colonias y siembra en caldo nutritivo para su posterior enfrentamiento a los discos de difusión

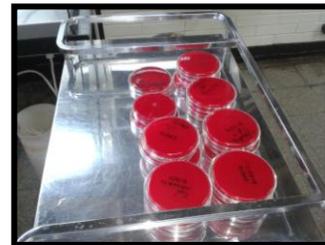


Fuente: Elaboración propia

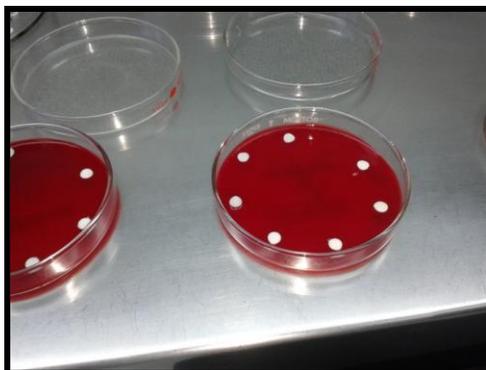


Fuente: Elaboración propia

Figura No. 4 Preparación de Agar Muller-Hinton, marcaje de cajas de Petri según esquema y concentración, vaciado del Agar en cajas de Petri (PEO, 2005)



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Aceite de Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*)

1. 10 µg/ml

2. 20 µg/ml

3. 30 µg/ml

**Enrofloxacin al 10%
(Control Positivo)**

4. 2.5 µg/ml

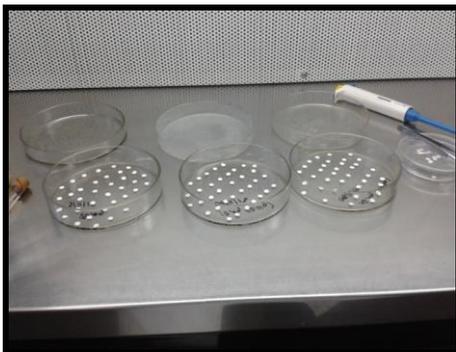
5. 5 µg/ml

6. 10 µg/ml

Control Negativo

7. No impregnado

Figura No. 5 Impregnación de discos de difusión con las concentraciones de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) (PEO, 2005)

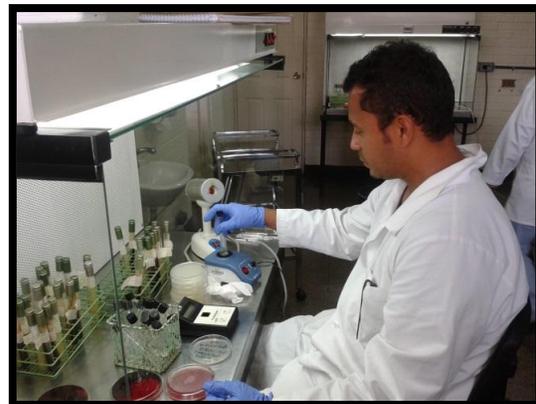


Fuente: Elaboración propia

Figura No. 6 Siembra de las bacterias a enfrentar al aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en el Agar. (PEO, 2005)



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Figura No. 7 Posicionamiento de los discos de difusión según esquema en las placas de Petri conteniendo las bacterias sembradas en el Agar Muller-Hinton e incubación a 27 °C durante 24 horas. (PEO, 2005)



Fuente: Elaboración propia

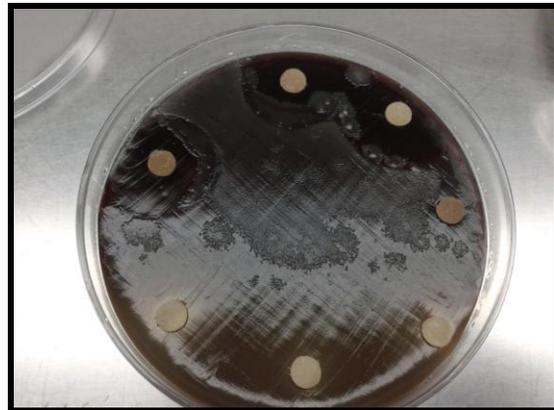


Fuente: Elaboración propia

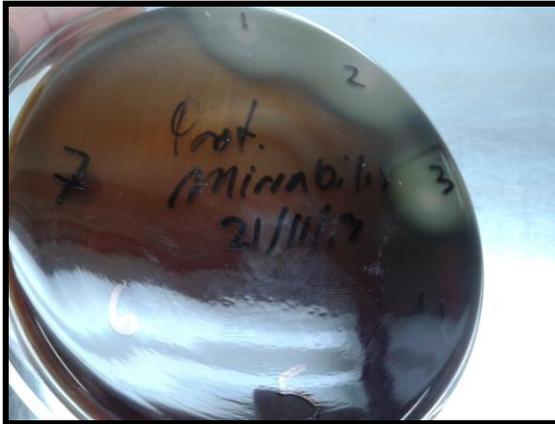
Figura No. 8 Resultados del enfrentamiento del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a las diferentes cepas bacterianas aisladas de los hisopados bucales de perros



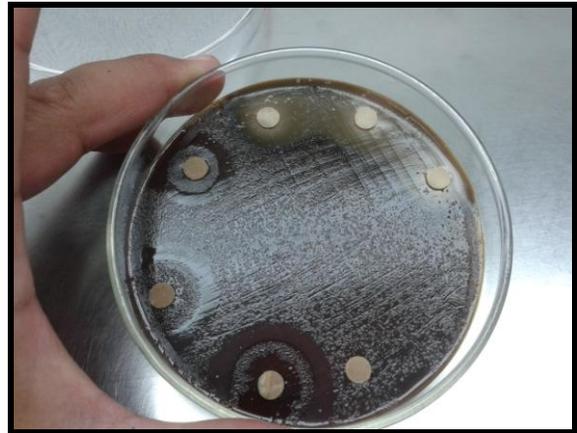
Fuente: Elaboracion propia



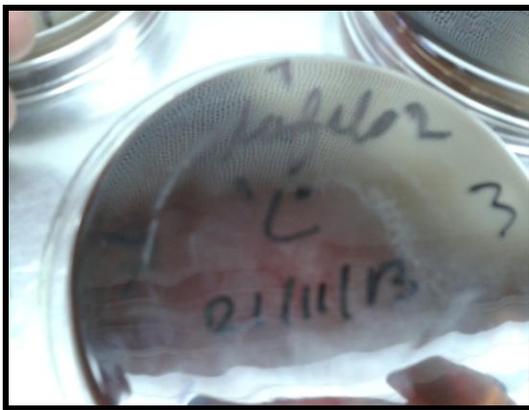
Fuente: Elaboración propia



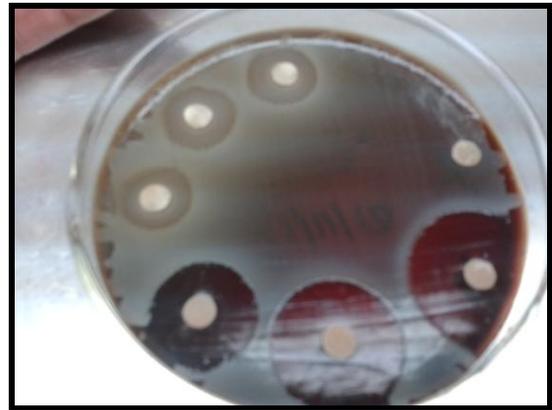
Fuente: Elaboracion propia



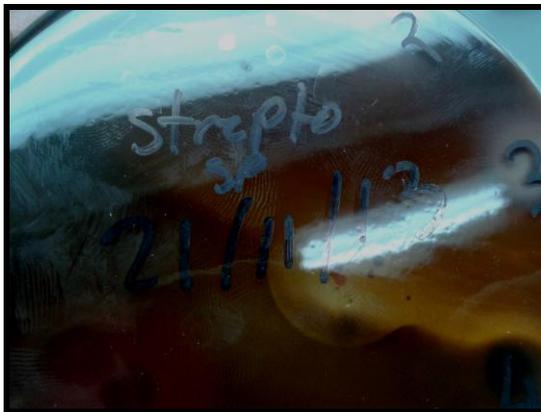
Fuente: Elaboracion propia



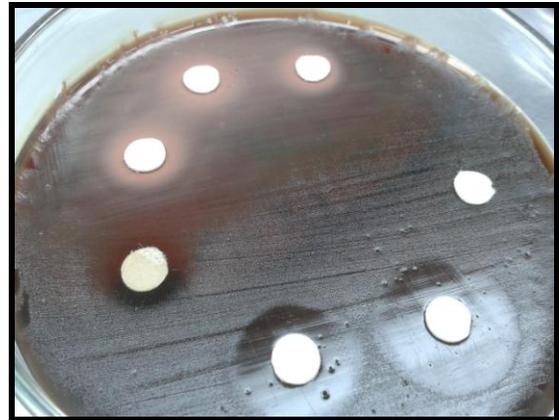
Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia



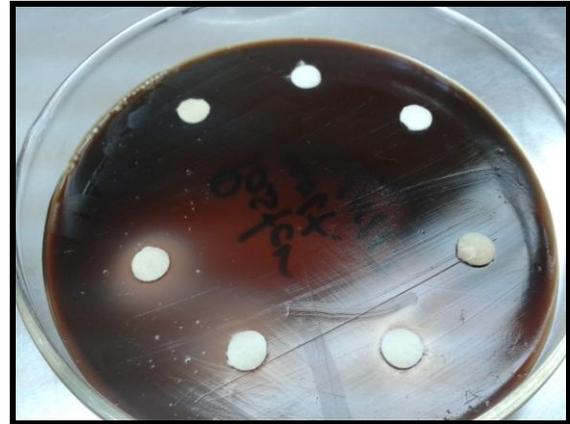
Fuente: Elaboración propia



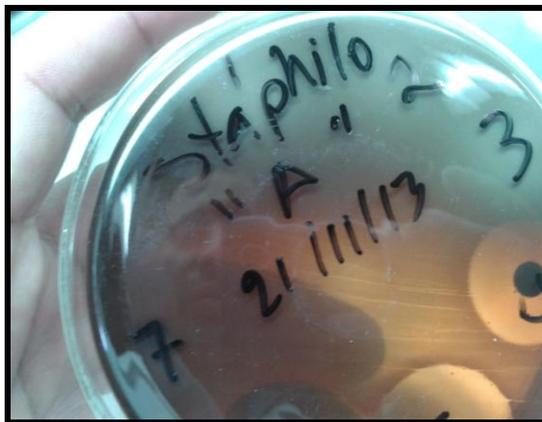
Fuente: Elaboración propia



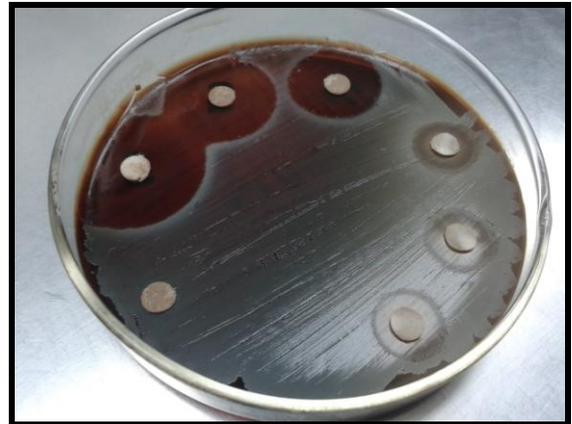
Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA IN VITRO DEL ACEITE
DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*) EN BACTERIAS
COMUNMENTE AISLADAS EN CAVIDAD ORAL DE PERROS, A
REALIZAR EN LOS AÑOS 2012 A 2013**

f. _____
CONRADO HEMARIANO MARROQUÍN ÁLVAREZ

f. _____
M.A. Dora Elena Chang de Jo
ASESOR PRINCIPAL

f. _____
M.V. Andrea Lorena Portillo García
ASESOR

f. _____
M.V. Virginia Bolaños de Corzo
ASESOR

f. _____
M.A. Gustavo Enrique Taracena
ASESOR

f. _____
M.V. Cesar Leonardo Estrada Girón
EVALUADOR

IMPRÍMASE

f. _____
M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
DECANO

