

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

ACTIVIDAD BIOCIDA
DE UN PROPOLIS CHILENO
FRENTE A *Porphyromonas gingivalis*:
ESTUDIO *in vitro*

PABLO IGNACIO DEL RÍO MARTÍNEZ

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
PROF. MARTA K. GAJARDO R.

TUTORES ASOCIADOS
PROF. DRA. VIOLETA PAVEZ
PROF. GLORIA MONTENEGRO
PROF. RODRIGO PIZARRO

SANTIAGO - CHILE
2006

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

ACTIVIDAD BIOCIDA
DE UN PROPOLIS CHILENO
FRENTE A *Porphyromonas gingivalis*:
ESTUDIO *in vitro*

PABLO IGNACIO DEL RÍO MARTÍNEZ

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
PROF. MARTA K. GAJARDO R.

TUTORES ASOCIADOS
PROF. DRA. VIOLETA PAVEZ
PROF. GLORIA MONTENEGRO
PROF. RODRIGO PIZARRO

SANTIAGO - CHILE
2006

*A mi padre y abuelita Lucía, ambos fallecidos,
por ayudarme en todo momento*

A mi madre, por su cariño y apoyo incondicional

Y a mi pareja Nadia por ser como es...

AGRADECIMIENTOS

- A mis tutores, en especial a la Prof. Marta Gajardo del Depto. de Patología, Área de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, por sus conocimientos, apoyo, y gran colaboración. Sin ella no hubiera podido realizar este trabajo.
- A la prof. Dra. Violeta Pávez del Depto. de Odontología Conservadora, Área Periodoncia, Universidad de Chile. Al Prof. Rodrigo Pizarro, y a la Prof. Gloria Montenegro, ambos del Depto. de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Todos ellos les doy las gracias por haber participado en mi tesis.
- Al Dr. Carlos Parra y a la Sra. Aidé, por su amabilidad y cooperación en el proceso de recolección de muestras.
- Al Sr. Enrique Saldiaz, por su gran ayuda en la preparación y obtención del propolis.
- Al Sr. Jaime Donoso por su valiosa colaboración en el laboratorio de Microbiología.
- A la jubilada, Sra. Fresia Pincheira, por todo el apoyo y consejos brindados durante la carrera.
- A todos los funcionarios de la Escuela que durante todos estos años me han brindado su apoyo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO	5
I.- ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	5
Definición.....	5
Etiopatogenia.....	8
Biofilm de placa dental subgingival y ecología bacteriana.....	12
II.- PORPHYROMONAS GINGIVALIS	20
Descripción.....	20
Taxonomía.....	22
Nutrición	22
Factores de virulencia	23
III.- USO DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONALES EN PERIODONCIA.....	27
a) Terapia antibiótica sistémica	28
b) Terapia antibiótica local	33
IV.- BIOCIDAS NATURALES	37
Propolis.....	38
a) Composición química y origen botánico	40
b) Características físico-químicas.....	45
c) Actividad biológica.....	47
Actividad biocida	49
d) Mecanismo de acción.....	52
e) Uso de propolis en Odontología.....	53
f) Reacciones adversas	56
HIPÓTESIS	58
OBJETIVO GENERAL.....	58
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
MATERIALES Y MÉTODO	60
1.- PACIENTES	60
2.- TOMA DE MUESTRA DE PLACA DENTAL SUBGINGIVAL.....	61
3.- SIEMBRA Y CULTIVO DE LAS MUESTRAS	61
a. Medio de cultivo.....	61
b. Dilución y siembra de las muestras.....	62
c. Cultivo	62
4.- IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE COLONIAS DE <i>P.GINGIVALIS</i>	63
a. Identificación.....	63

<i>b. Aislamiento y resiembra</i>	64
5.- ORIGEN DEL PROPOLIS	64
<i>a. Preparación del propolis</i>	64
<i>b. Determinación del origen botánico del propolis</i>	65
6.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL PROPOLIS	67
<i>a. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)</i>	67
<i>b. Evaluación de la actividad inhibitoria del alcohol utilizado como solvente del propolis</i>	71
7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	72
RESULTADOS	73
I.- DETERMINACIÓN DEL ORIGEN BOTÁNICO DEL PROPOLIS CHILENO USADO EN ESTE ESTUDIO	73
II.- OBTENCIÓN DE AISLADOS DE <i>P.GINGIVALIS</i>	77
III.- DETERMINACIÓN DE LA CIM DE PROPOLIS FRENTE A <i>P.GINGIVALIS</i>	81
IV.- DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ALCOHOL SOBRE EL DESARROLLO DE <i>P.GINGIVALIS</i>	85
DISCUSIÓN	87
I.- DETERMINACIÓN DEL ORIGEN BOTÁNICO DEL PROPOLIS.....	87
II.- DETERMINACIÓN DE LA CIM DEL PROPOLIS CHILENO FRENTE A <i>P.GINGIVALIS</i>	88
CONCLUSIONES.....	94
SUGERENCIAS.....	96
RESUMEN	98
REFERENCIAS.....	100
ANEXO	120

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

TABLAS

TABLA I	
GRADO DE ASOCIACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS CON LA PROGRESIÓN DE PERIODONTITIS	18
TABLA II	
LISTA DE REACCIONES ADVERSAS DE ANTIBIÓTICOS USADOS EN LA TERAPIA PERIODONTAL	31
TABLA III	
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE PROPOLIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM).....	68
TABLA IV	
PORCENTAJE DE LOS DIFERENTES TIPOS BOTÁNICOS ENCONTRADOS EN LA MUESTRA DE PROPOLIS, APLICANDO EL TEST ESTADÍSTICO DE ANÁLISIS DE PROPORCIÓN	76
TABLA V	
DESARROLLO DE AISLADOS DE <i>P. GINGIVALIS</i> A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPOLIS	82
TABLA VI	
RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE PROPOLIS Y NÚMERO DE AISLADOS DE <i>P. GINGIVALIS</i> CON Y SIN DESARROLLO	83
TABLA VII	
PORCENTAJE DE AISLADOS DE <i>P. GINGIVALIS</i> CON Y SIN DESARROLLO A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPOLIS	83
TABLA VIII	
EFEECTO DEL ALCOHOL SOBRE EL DESARROLLO DE LOS AISLADOS DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	86

GRÁFICOS

GRÁFICO 1	
COMPOSICIÓN BOTÁNICA, EN PORCENTAJE, DE LA MUESTRA DE PROPOLIS	74
GRÁFICO 2	
NÚMERO DE AISLADOS DE <i>P. GINGIVALIS</i> DESARROLLADOS EN RELACIÓN A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPOLIS	84
GRÁFICO 3	
LÍNEA DE TENDENCIA O REGRESIÓN LINEAL ENTRE EL NÚMERO DE AISLADOS DE <i>P. GINGIVALIS</i> DESARROLLADOS EN RELACIÓN A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPOLIS	84

INTRODUCCIÓN

La periodontitis representa un grupo de patologías infecciosas que afectan a las estructuras que rodean el diente de tipo específica. Cuando progresa, la periodontitis puede causar la destrucción de los tejidos de soporte dentario, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar, y luego la pérdida de la pieza dentaria^(1,2).

Se piensa que el inicio y la progresión de la periodontitis es el resultado de una compleja interacción entre las bacterias que colonizan el surco gingivo-dentario y la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero susceptible⁽³⁾.

Así, estas enfermedades han sido asociada con la presencia subgingival de una microbiota variada y numerosa. Sin embargo, de acuerdo a la hipótesis de placa específica, sólo unas 20 de las más de 500 especies bacterianas descritas en esta microbiota, se consideran como potenciales patógenos periodontales⁽⁴⁾. Dentro de ellas se destaca la especie *Porphyromonas gingivalis*, bacilo Gram negativo, anaerobio estricto, formador de colonias “pigmentadas de negro” cuando se cultiva en agar sangre con hemina y menadiona^(1,5,6).

Porphyromonas gingivalis es una de las especies de bacterias patógenas más fuertemente asociadas tanto al inicio como a la progresión de la periodontitis^(7,8).

Pertenece a la Familia *Porphyromonadaceae*, Orden *Bacteroidales*⁽⁹⁾. Se piensa que *P. gingivalis* coloniza en forma tardía o secundaria la cavidad bucal, proceso que es facilitado por la presencia de otras especies bacterianas, colonizadores primarios, que proporcionan sitios de unión y nutrientes, y que contribuyen a reducir la tensión de oxígeno a niveles óptimos para su crecimiento. Se ha demostrado que esta bacteria se adhiere a colonizadores tempranos, tales como *Streptococci bucales* y *Actinomyces naeslundii*, y también a otros colonizadores mas tardíos tales como *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema dentícola* y *Tannerella forsythensis*⁽¹⁰⁾.

En relación con la prevención y/o tratamiento de la periodontitis, los métodos tradicionales incluyen la remoción mecánica de la placa dental supragingival y subgingival, y el uso de agentes antimicrobianos tales como penicilinas (amoxicilina), quinolonas (ciprofloxacino), tetraciclinas (doxiciclina), metronidazol y eritromicina, entre otros⁽¹¹⁾.

Sin embargo, siendo la periodontitis una patología crónica, se ha planteado el desafío de buscar nuevas opciones de antibioterapia frente a la creciente aparición de cepas resistentes a los antibióticos comúnmente usados, y para evitar reacciones adversas y contraindicaciones que poseen algunos de ellos⁽¹²⁾.

En la actualidad se está investigando ampliamente el uso de nuevas alternativas a los antibióticos convencionales, las que incluyen sustancias químicas sintetizadas en laboratorios y productos que provienen de la naturaleza. Es así que etno-farmacólogos, botánicos, microbiólogos, y bioquímicos, están trabajando en la investigación de sustancias fitoquímicas para desarrollar tratamientos contra enfermedades infecciosas basados en productos naturales. El uso y búsqueda de suplementos dietarios derivados de sustancias naturales ha sido acelerado en los últimos años. El 25 por ciento de estos son derivados de plantas, sin embargo, ninguno de ellos es usado actualmente como antimicrobiano⁽¹³⁾.

Recientemente, se ha puesto especial atención a las indicaciones médicas de un producto natural, denominado propolis o propóleos, el que ha mostrado interesantes propiedades medicinales⁽¹⁴⁾. Propolis fue usado por la medicina antigua durante cientos de años. Es un compuesto natural elaborado por abejas productoras de miel (*Apis mellifera*) a partir de la resina y exudados de varias plantas⁽¹⁴⁾. Las abejas recolectan el exudado vegetal y forman pequeños grumos con sus mandíbulas, mezclando dicho exudado con cera y productos de las glándulas salivales de ellas mismas. El material resultante es usado para fortificar el panal, proveyendo protección frente a microorganismos, y como una sustancia para embalsamar el

cuerpo de algún invasor, para que éste no se descomponga⁽¹⁴⁾. Además, propolis presenta otras numerosas propiedades biológicas, entre las que se destaca su actividad antimicrobiana, la cual, al igual que las demás propiedades, varía dependiendo tanto de la ubicación geográfica, de las especies vegetales de las cuales fue obtenido⁽¹⁶⁾, como de la estación del año en que se obtuvo^(14,16).

La actividad biocida *in vitro* de propolis frente a *S. mutans*, fue recientemente estudiada en Chile por Guzmán⁽⁴⁰⁾, quien determinó una concentración inhibitoria mínima de 800 µg/ml. Fajuri et al⁽¹⁵⁾, estudió el efecto del propolis sobre diferentes microorganismo patógenos orales, entre los cuales incluyó *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*. Sus resultados mostraron inhibición de crecimiento de todos ellos, excepto de *Porphyromonas gingivalis*. Así, en base a los antecedentes mencionados, en el presente estudio se investigó la actividad biocida de un tipo de propolis chileno, marca Apiherbal®, frente al crecimiento *in vitro* de aislados bacterianos de *Porphyromonas gingivalis*, obtenidos de pacientes chilenos con periodontitis. La cuantificación de esta actividad se realizó mediante la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM).

MARCO TEÓRICO

I.- ENFERMEDAD PERIODONTAL

Definición

El periodonto está constituido por los tejidos de protección y apoyo del diente; se compone de encía (periodonto de protección), ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar (periodonto de inserción); estos tejidos están sujetos a variaciones morfológicas y funcionales, así como a cambios motivados por la edad⁽¹⁷⁾.

Las enfermedades periodontales son lesiones con características inflamatorias causadas por una infección por placa bacteriana y/o patógenos específicos. Existen dos grandes cuadros: gingivitis, la cual corresponde a una respuesta inflamatoria del tejido gingival frente a la acumulación de placa bacteriana⁽¹⁸⁾, y periodontitis, que corresponde a una patología infecciosa de tipo específica, con características inflamatorias que afecta los tejidos de soporte dentario, es decir, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar^(1,2). A diferencia de la gingivitis, en la periodontitis existe pérdida de inserción conectiva en presencia de sacos periodontales, reabsorción ósea, e inflamación en grados variables⁽¹⁹⁾. La periodontitis es causada por un sobrecrecimiento de bacterias periodontopatógenas en la placa

subgingival, seguida de una respuesta inmuno-inflamatoria en un hospedero susceptible⁽³⁾.

La Periodontitis no tratada, o tratada inadecuadamente, es la principal causa de pérdida de piezas dentarias en adultos, lo que a su vez trae consecuencias tanto en la estética como en la fisiología y psicología del paciente. En la región Metropolitana, más del 98.78% de la población entre 35 y 44 años presenta alguna manifestación de periodontitis. Es considerada como factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, diabetes, parto prematuro y niños de bajo peso al nacer^(20,21).

Resumen de la clasificación de condiciones y patologías periodontales según reporte de la Academia Americana de Periodontología⁽¹⁷⁾.

- Gingivitis:
 - Asociada a placa bacteriana
 - No asociada a placa bacteriana
- Periodontitis crónica
 - Localizada
 - Generalizada
- Periodontitis agresiva

- Localizada
- Generalizada
- Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas
 - Asociada con trastornos hematológicos
 - Asociada con trastornos genéticos
 - No especificada de otro modo (NEOM)
- Enfermedades periodontales necrotizantes
 - Gingivitis úlceronecrotizante aguda (GUNA)
 - Periodontitis úlceronecrotizante (PUN)
- Abscesos del periodoncio
- Periodontitis asociada con lesiones endodónticas
- Afecciones y malformaciones adquiridas o de desarrollo
 - Factores localizados relacionados con el diente que modifican o predisponen a enfermedades gingivales o periodontitis inducidas por placa
 - Malformaciones mucogingivales y lesiones alrededor de los dientes

- Malformaciones mucogingivales y afecciones de los rebordes desdentados
- Trauma oclusal

Etiopatogenia

Numerosos estudios han demostrado que las enfermedades periodontales son de naturaleza infecciosa y que los microorganismos presentes en la placa bacteriana, localizada en la región del surco gingivo-dentario o placa subgingival, constituyen el agente etiológico principal de las enfermedades^(22,23, 24).

Las bacterias colonizan la superficie dentaria en la región del surco gingivo-dentario, donde se multiplican y se extienden en dirección apical, formando la placa subgingival o biofilm bacteriano subgingival, el cual es responsable de albergar un gran número de especies bacterianas. Se han descrito más de 500 de éstas especies, entre las cuales, las de mayor prevalencia en la periodontitis son *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* (antes *Bacteroides forsythus*), y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, principalmente⁽²⁵⁾. Estas bacterias tienen un papel significativo en la patogénesis de la periodontitis, participando en la formación del

saco periodontal, la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar a través de mecanismos directos e indirectos⁽²⁶⁾. Otras especies, como *Fusobacterium nucleatum*, especies de *Campylobacter*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Peptoestreptococcus micros* (*Micromonas micros*) y varias espiroquetas, también han sido implicados en periodontitis destructiva. El rol de estas especies bacterianas en la patogénesis de la periodontitis está basado en su alta frecuencia de aislamiento y su potencial patogénico que incluye factores de virulencia, que les permiten evadir los sistemas de defensa del hospedero^(5,27). Estos incluyen la habilidad para unirse a células epiteliales y proteínas de la matriz extracelular, producir una gran cantidad de proteasas, colagenasas, endotoxinas (LPS), mecanismos de resistencia antibiótica, bacteriocinas, producción de inhibidores quimiotácticos, leucotoxinas, citoquinas metabólicas tóxicas (H₂S, putrecinas), proteínas inmunosupresoras, etc⁽²⁷⁾.

Sin embargo, aunque la infección bacteriana es el agente etiológico de la periodontitis, la respuesta inmune desarrollada por el individuo frente a la agresión bacteriana es en gran medida responsable de los procesos inflamatorios que pueden generar en grado extremo la destrucción de los tejidos duros y blandos del periodonto, adquiriendo importancia entre estos mecanismos, tanto la magnitud de la respuesta,

como el balance/desbalance que se establece entre los diferentes componentes de la respuesta inmune⁽²⁶⁾.

Los procesos inflamatorios conllevan tanto la activación de macrófagos como la infiltración de leucocitos provenientes desde la sangre. La activación de células inmunocompetentes induce diversos cambios entre los que se incluyen la producción y secreción de citokinas⁽²⁶⁾. Las citoquinas pro-inflamatorias, producidas por células como monocitos-macrófagos, linfocitos y fibroblastos, son sintetizadas y secretadas en respuesta a bacterias, y tienen un papel primordial en la inducción y posterior mantenimiento de la respuesta inflamatoria, como en la destrucción tisular en la periodontitis que se produce en la periodontitis⁽²⁹⁾.

Estas enzimas proteolíticas (MMPs), son producidas en todo el organismo por diferentes tipos celulares tales como leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNNs), macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, y también por bacterias orales patógenas.

Las MMPs juegan un importante rol en la mantención de la integridad de los tejidos conectivos, pudiendo degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular. Participan además, en el metabolismo del hueso alveolar que finalmente producen colapso y destrucción del ligamento periodontal y una reabsorción del

hueso. Se ha visto que las MMP-9 y MMP-2 se presentan en altos niveles en pacientes con periodontitis activa, en comparación con sujetos sanos, y que luego de someterse a un tratamiento periodontal, su concentración baja notablemente. La importancia de la respuesta inflamatoria del hospedero en la patogénesis periodontal ha presentado la oportunidad para explorar nuevas estrategias en el tratamiento de la periodontitis^(30,31).

Las células del epitelio de unión actúan como una barrera mecánica para el ingreso de microorganismos y como sensores de infección microbiana, generando y transmitiendo señales entre las bacterias y las células de tejidos subyacentes a los tejidos periodontales incluidas células inmunitarias. *Porphyromonas gingivalis* es capaz de penetrar los tejidos gingivales, y de localizarse intracelularmente en las células del hospedero, alterando así la fisiología celular normal⁽¹⁰⁾.

La invasión de células por *Porphyromonas gingivalis* afecta la inmunidad innata del hospedero, ya que por ejemplo, la secreción de IL-8 por células epiteliales gingivales es inhibida luego de la invasión bacteriana. *Porphyromonas gingivalis*, al inhibir las IL-8 en sitios de invasión gingival, podría generar un efecto debilitante en la defensa innata del hospedero, donde la exposición bacteriana es constante. De esta forma, el hospedero no sería capaz de detectar la presencia bacteriana y no activaría a

los leucocitos para su remoción, resultando en un sobrecrecimiento bacteriano que contribuiría a una exacerbación de la periodontitis⁽¹⁰⁾.

Con respecto al impacto que produce *Porphyromonas gingivalis* en el metabolismo del hueso, este microorganismo por una variedad de mecanismos intrincados e interconectados, puede contribuir a la pérdida de hueso alveolar estimulando la reabsorción de hueso e inhibiendo la formación de éste. LPS de *Porphyromonas gingivalis* pueden activar a los osteoclastos directamente y causar la liberación de prostaglandina E (PGE), y citokinas IL-1 β y TNF- α desde los macrófagos, monocitos y fibroblastos. Estos compuestos son potentes mediadores locales de la reabsorción de hueso y además, pueden inhibir la síntesis de colágeno realizada por los osteoclastos e inducir la producción de MMPs del hospedero, las que destruirían hueso y tejido conectivo⁽¹⁰⁾.

Biofilm de placa dental subgingival y ecología bacteriana

El concepto de biofilm es definido como una comunidad microbiana asociada a la superficie dentaria o a cualquier otro material duro no descamable⁽³²⁾. El biofilm se caracteriza por la rápida formación de capas de microorganismos debido al amplio

desarrollo bacteriano, acompañado por la producción de grandes cantidades de polímeros extracelulares tipo polisacáridos. Esto protege a los microorganismos de los antimicrobianos. La placa dental como depósito microbiano natural constituye un verdadero biofilm, que se compone de bacterias incluidas en una matriz compuesta, principalmente, por polímeros extracelulares, productos salivales y exudados gingivales⁽³³⁾. Cuando la higiene supragingival no es mantenida adecuadamente, se desarrolla la placa dental por una interacción dinámica bacteriana en el interior de la placa, la cual llega a su máximo desarrollo con el establecimiento de una comunidad con una microbiota característica. Los microorganismos en la placa supragingival, como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, se nutren de componentes salivales y de los alimentos, produciendo tempranamente ácidos orgánicos a partir de carbohidratos. La placa subgingival se forma a expensas de la placa supragingival, y una vez establecida, producirá y liberará lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos entre otras sustancias. Las bacterias periodontopatógenas de la placa subgingival son principalmente proteolíticas, asacrolíticas o bacterias de débil fermentación. Reciben los componentes de fluidos crevicular gingival y fluido inflamatorio, incrementando en número, y produciendo varios tipos de exotoxinas y enzimas proteolíticas, cuya acción resulta en una gran destrucción periodontal.

El proceso dinámico en la génesis del biofilm bacteriano subgingival tiene las siguientes etapas, brevemente:

- Bacterias cocáceas Gram positivo se unen a la película dental adquirida en la superficie del diente.
- Las células crecen en número y se esparcen sobre la superficie dentaria actuando como **colonizadores primarios**.
- Comienza un proceso de agregación entre células bacterianas de la misma especie o de especies diferentes. La comunidad que crece dentro del biofilm, constituye la **sucesión primaria**.
- El microambiente interno de la comunidad cambia de aeróbico a anaerobio, a consecuencia del crecimiento bacteriano. La comunidad se reorganiza, y se establece la **sucesión secundaria**.
- El microambiente interno de la comunidad se hace cada vez más anaeróbico, y la comunidad bacteriana se reorganiza nuevamente.
- Finalmente, se establece una comunidad estable, formada por una amplia gama de especies, llamada **comunidad clímax**.

El biofilm de la placa supragingival adherido a la superficie del diente está dominado por especies de bacterias cocáceas y bacilares facultativas Gram positivo,

de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*⁽³⁴⁾. Se ha visto que en encías saludables y en sacos con tratamientos periodontales exitosos, existe una microbiota predominantemente compuesta por organismos facultativos Gram positivo como *Streptococcus* y *Actinomyces*. Las bacterias Gram positivo muestran poco o ningún potencial periodontopatógeno y ayudan a proteger en contra de la colonización de patógenos periodontales. Sin embargo, la placa supragingival contiene muchos productos bioactivos, como ácidos orgánicos fermentados, componentes sulfurosos, enzimas, peptidoglicanos, y LPS. Estos componentes pueden difundir hacia la superficie del epitelio gingival e incrementar el fluido crevicular gingival y el fluido inflamatorio del tejido periodontal. Este aporte nutricional extra, hace que en hospederos susceptibles las bacterias proteolíticas en la placa, expandan su nicho ecológico y produzcan proteasas, acelerando la destrucción tisular, y creando así las condiciones óptimas para el establecimiento de la placa subgingival. Estos descubrimientos sugieren que las proteasas producidas por *P. gingivalis*, *B. forsythus*, y *T. dentícola*, podrían estar involucradas en la iniciación de la enfermedad⁽³⁵⁾.

La placa subgingival puede ser de 3 tipos: adherida, libre, y asociada al epitelio. La placa subgingival adherida, está asociada a la superficie dentaria y está compuesta por bacilos y cocos Gram positivo. Estas poblaciones sobreviven bajo limitadas

condiciones anaeróbicas y nutricionales, y son relativamente estables en la placa subgingival. Este tipo de placa está también asociada con el depósito de cálculo y caries radicular. La placa subgingival libre está dominada por bacilos móviles y Gram negativo, los que se extienden hasta la frontera de la placa más apical. Esta parece ser el área más bioactiva, porque una gran cantidad de fluido crevicular inflamatorio es excretado del tejido periodontal. Los periodontopatógenos *P. gingivalis* y *T. dentícola* son considerados causantes de inducir y acelerar el proceso inflamatorio. La placa asociada al epitelio está débilmente unida al epitelio gingival, y está conformada por bacilos Gram negativo y móviles. Estudios inmunológicos han revelado que *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*, están entre los principales miembros de la comunidad asociada al epitelio. Se considera que este tipo de placa juega un importante rol en la patogénesis de la periodontitis, y que está especialmente involucrada en la invasión bacteriana del tejido conectivo. Estos tres tipos de placas subgingival están estrechamente relacionadas y constituyen el ecosistema de la comunidad microbiana subgingival⁽³⁶⁾.

De placa supragingival a subgingival, hay una significativa disminución de *Streptococci* y especies de *Actinomyces*, acompañada por un incremento de

Tannerella forsythensis (*Bacteroides forsythus*), *Porphyromonas gingivalis*, y *Treponema denticola*⁽⁷⁾.

Las lesiones periodontales son por lo tanto, causadas por un grupo de patógenos más que por una sola especie patógena, y los patógenos más relacionados con la periodontitis son principalmente originarios de la cavidad oral. Pero se ha demostrado que microorganismos superinfectantes tales como bacilos entéricos Gram negativo, pseudomonas, staphylococcus, levaduras, también habitan los sacos periodontales⁽³⁷⁾.

En la Tabla I se resume el grado de asociación de los principales patógenos periodontales con el proceso de progresión de la periodontitis, de acuerdo a Haffajee y Socransky⁽²⁾ y Slots y Chen⁽³⁸⁾.

Tabla I

Grado de asociación de especies bacterianas con la progresión de periodontitis

Muy fuerte	Fuerte	Moderado	Estadios tempranos de investigación
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Campylobacter rectus</i>	Bacilos entéricos Gram negativo
<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i>	<i>Dialister pneumosintes</i> <i>Dialister invisus</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i> (<i>Micromonas micros</i>)	Especies de <i>Pseudomonas</i>
<i>Tannerella forsythensis</i>	<i>Eubacterium nodatum</i> <i>Treponema denticola</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Especies de <i>Staphylococcus</i>
Espiroquetas de gingivitis aguda necrotizante		<i>Salenomonas noxia</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Streptococci beta-hemolítico</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Cándida albicans</i>

Actinobacillus actinomycescomitans, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythensis*, han sido fuertemente asociadas con periodontitis crónica, progresión de la enfermedad y terapia periodontal no exitosa⁽⁷⁾.

A su vez, periodontitis agresiva está asociada con una alta proporción de anaerobios (90%), organismos Gram negativo (75%), y espiroquetas (30%). La infección podría ser causada por un número limitado de especies bacterianas, entre ellas, *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Dialister*

pneumosintes, *Tannerella forsythensis* y *Treponema denticola*. Otros bacilos anaerobios Gram negativo, algunas bacterias Gram-positivo, e incluso, bacilos entéricos/pseudomonas podrían tener un rol en la etiopatogenia de la periodontitis agresiva⁽³⁵⁾.

Porphyromonas gingivalis es considerado por tanto, como uno de las especies más fuertemente asociadas con periodontitis crónica y periodontitis agresiva⁽⁸⁾, y usualmente está entre los más tardíos colonizadores de la cavidad oral, requiriendo de organismos antecesores que creen las condiciones medioambientales necesarias, para su adherencia, suministrando sustratos para su crecimiento, y reduciendo los niveles de oxígeno a niveles bajos, que es lo que requiere para crecer y sobrevivir esta especie anaerobia estricta⁽¹⁰⁾.

En un estudio realizado en la población chilena, *Porphyromonas gingivalis* fue más prevalente que *Actinobacillus actinomycescomitans*, tanto en periodontitis crónica como en periodontitis agresiva⁽³⁹⁾, razón por la cual fue la especie de periodontopatógeno elegida para este estudio.

II.- PORPHYROMONAS GINGIVALIS

Descripción

Porphyromonas gingivalis es una especie de bacilos Gram negativo pequeño (cocobacilos), no móvil, anaerobio estricto, asacrolítico, que forma colonias uniformes de coloración verdosas, pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular (Fig. 1). Células de *P. gingivalis* tienen un diámetro de 0.5-0.8 μ m por 1.0-3.5 μ m de largo⁽⁴¹⁾.



Figura 1: se observa un grupo de colonias color verdosas, pardas o negras de *Porphyromonas gingivalis*

Algunos de los tipos poseen actividad proteolítica, como por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas macacae*, otros son relativamente no

proteolíticos. Cuando crecen en complejos carbohidratados (excepto *Porphyromonas gingivalis* asacarolítica) y proteínas, los principales productos de fermentación son n-butilato, propionato y acetato, y en menor cantidad iso-valerato, iso-butilato, succinato y fenilacetato. Estos productos finales explicarían muchos de los malos olores asociados con infecciones orales⁽⁴¹⁾.

Como se mencionó anteriormente, *P. gingivalis* es un importante miembro de la microbiota periodontal, involucrado tanto en la progresión de la periodontitis, como en los procesos de destrucción de hueso y tejido⁽⁴¹⁾. También, puede producir severas infecciones extraorales, incluyendo mediastinales, de planos faciales, cerebro y abscesos pulmonares⁽⁴²⁾, enfermedades cardíacas⁽²¹⁾, parto prematuro y bajo peso al nacer⁽⁴³⁾.

Porphyromonas gingivalis es comúnmente detectada en pacientes jóvenes con gingivitis, y pacientes adultos con periodontitis, usando métodos inmunológicos y de biología molecular (PCR). Esta especie también se ha encontrado en placas supragingivales maduras, de pacientes jóvenes con o sin destrucción periodontal, sugiriendo que es un patógeno de tipo oportunista, para el cual no está claro aún, si es de origen endógeno o exógeno⁽³⁶⁾.

Taxonomía

El género *Porphyromonas*, específicamente la especie *Porphyromonas gingivalis*, fue definido a partir del grupo *Bacteroides melanigogenicus*⁽⁴⁴⁾ dada la heterogenicidad genética de este grupo, demostrada por Shah y Hardie⁽⁴⁵⁾, y Coykendall et al⁽⁴⁶⁾. Por medio de la técnica de hibridación DNA-DNA, se propuso una nueva especie, *Bacteroides gingivalis* para estas bacterias de origen bucal⁽⁴⁷⁾. Luego, por la secuencia de rRNA de 16S, *Porphyromonas* se alejó genealógicamente de *Bacteroides* y *Prevotella*⁽⁴⁴⁾. Especies del género *Porphyromonas* se han encontrado asociadas con hospederos humanos y/o animales⁽⁴¹⁾.

Nutrición

Porphyromonas gingivalis es una especie proteolítica, asacarolítica, anaerobia estricta, por lo que coloniza sitios en donde la tensión de oxígeno es baja, pero en los cuales hay substratos abundantes en nitrógeno. El ecosistema subgingival proporciona un medioambiente ideal para esta especie, ya que, el potencial rédox es bajo (y más bajo aún en sacos periodontales), y posee nutrientes endógenos ricos en péptidos y aminoácidos⁽⁴⁴⁾.

P. gingivalis tiene un requerimiento obligado de hierro para crecer. Sin embargo, cuando ocurre una falta de hierro en el sistema de poros de la bacteria (sideporos, los cuales quelan hemina) utiliza hemina (hierro protoporfirina IX). Los niveles de hemina en boca son variables y el sangramiento, como resultado de la inflamación gingival, elevaría su concentración subgingival, de modo que este puede ser un factor que predispone a la acumulación de esta bacteria. La hemina que se acumula en la membrana extracelular actúa como "basurero" de oxígeno ayudando a mantener un microambiente anaerobio⁽¹⁰⁾.

Factores de virulencia

Se ha demostrado que LPS de esta especie induce la producción de IL-6 e IL-8 desde fibroblastos del ligamento periodontal en humanos. Las evidencias indican que LPS de *Porphyromonas gingivalis*, especialmente su lípidoA, es capaz de estimular la respuesta inflamatoria del hospedero indirectamente a través de la producción de citokinas⁽⁴¹⁾.

Porphyromonas gingivalis produce un gran número de enzimas, proteinasas y productos finales de su metabolismo que son activos contra un amplio espectro de

proteínas del hospedero, y está provista de mecanismos para evadir las defensas de éste. Dichos compuestos corresponden a inhibidores de proteinasas, inmunoglobulinas, proteinasas que contienen hierro, proteínas bactericidas, proteínas de matriz extracelular, y proteínas íntimamente envueltas en funciones fagocíticas, tales como fijación de complemento y coagulación. La mayoría de las actividades enzimáticas de *Porphyromonas gingivalis* son asociadas a la proteinasa cisteína, la cual le proporciona ventajas metabólicas, ya que le otorga la capacidad de utilizar largas proteínas del hospedero para su crecimiento y desarrollo⁽⁴¹⁾. Una de las características de virulencia significativas de *Porphyromonas gingivalis* es este gran número de enzimas hidrolíticas, proteolíticas y lipolíticas, que son producidas esencialmente por todos los tipos de *P.gingivalis* conocidos. Varias de estas proteinasas asociadas a *P.gingivalis* (capaces de hidrolizar péptidos unidos) parecen ser funcionalmente importantes en el medioambiente *in vivo*. Estos factores de virulencia *in vivo*, si actúan en el hospedero, pueden jugar un rol significativo en la progresión de la periodontitis⁽⁴¹⁾.

Dentro de las proteinasas de *Porphyromonas gingivalis* se consideran a las colagenasas y a las aminopeptidasas como críticas en la patogénesis de la bacteria. Existen proteinasas específicas como arginina y lisina proteinasa, producidas por

Porphyromonas gingivalis. Son proteinasas cisteínas, y han recibido un nombre en común, gingipains. Estas son un potente regulador de la permeabilidad vascular, siendo capaces de inducir la permeabilidad vascular en plasma humano y unirse directamente a bradiquininas. Además, se consideran quimiotácticas para PMNN. Arg-gingipain es capaz de inactivar especies oxígeno reactivas (bactericidas naturales) producidos por PMNN, el cual es un importante mecanismo en la defensa del hospedero⁽⁴¹⁾.

Otro tipo de proteinasas que produce *Porphyromonas gingivalis* para protegerse de los mecanismos de defensa del hospedero son las proteinasas inmunoglobulinas como IgA1, IgA2 e IgG⁽⁴¹⁾.

Un tipo de proteinasas llamadas caseinolíticas son capaces de degradar colágeno tipo I y IV, IgG humana, fibronectina, y complemento C3, C4, C5 y C5a, también inhiben la actividad bactericida de PMNN⁽⁴¹⁾.

Existen unas proteínas bacterianas que actúan como factor de virulencia llamadas hemaglutininas. *Porphyromonas gingivalis* produce a lo menos cinco de ellas. Cuando se expresan en la superficie bacteriana, pueden promover la colonización mediante la unión de bacterias a receptores (usualmente oligosacáridos) en células humanas. Existe una relación entre la capacidad de hemaglutinación y la

actividad proteolítica de *Porphyromonas gingivalis*, lo que se ha dilucidado mediante análisis genéticos⁽¹⁰⁾.

III.- USO DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONALES EN PERIODONCIA

El objetivo principal de toda terapia periodontal es preservar tantos dientes como sea posible, retardando, deteniendo o revirtiendo la destrucción periodontal y previniendo la recurrencia de la enfermedad. Un tratamiento exitoso no solo está basado en el mejoramiento de los parámetros clínicos, e idealmente en la regeneración de las estructuras perdidas y la recuperación de la función normal, sino que también, en cambios cualitativos y cuantitativos dentro de la microbiota subgingival^(48,49).

Convencionalmente la terapia periodontal está basada en la supresión de los focos infecciosos subgingivales a través del debridamiento mecánico. El procedimiento incluye remover la placa bacteriana y el cálculo adherido supra y subgingival, pulido radicular⁽⁵⁰⁾, instrucción en higiene oral y eliminación de factores de retención de placa, en ciertos casos en conjunto con la cirugía periodontal⁽⁴⁸⁾. La estrategia microbiológica de la terapia periodontal aspira principalmente a eliminar las bacterias patógenas específicas^(48,50), y permitir la subsecuente recolonización por una microbiota compatible con salud⁽⁴⁹⁾. En general, el destartraje y el pulido radicular resuelven el proceso de inflamación, y detienen el curso de la

periodontitis^(48, 50). Sin embargo, áreas problemáticas como permanencia de sacos profundos, defectos óseos y furcaciones, no responden en forma óptima al debridamiento mecánico como única terapia⁽⁴⁸⁾.

En la antibioterapia existen dos rutas principales de liberación de fármacos en el interior del saco periodontal: sistémica, y directa o local.

a) Terapia antibiótica sistémica

El concepto de terapia antibiótica periodontal considera 3 aspectos fundamentales: tipo de fármacos, especies de microorganismos patógenos, y características del hospedero. La terapia antimicrobiana está basada en la premisa de que microorganismos específicos causan la destrucción periodontal, y que los agentes antimicrobianos a nivel subgingival pueden exceder la concentración mínima necesaria para eliminar a los patógenos⁽⁵⁰⁾. Por otro lado, los antibióticos de tipo sistémicos, penetran y afectan todos los nichos ecológicos de los microorganismos de la cavidad oral en forma total, de sitios enfermos y sanos. Esto podría ser una ventaja en situaciones donde los periodontopatógenos están distribuidos a través de la totalidad de la boca, como ha sido visto en algunos pacientes, incluyendo sitios como el dorso de la lengua y las amígdalas⁽⁵¹⁾.

Los pacientes que son candidatos a una terapia sistémica antimicrobiana son aquellos que exhiben continuamente pérdida del nivel de inserción periodontal a pesar de la terapia mecánica convencional. Se debe prescribir antibióticos en pacientes con periodontitis refractaria, la cual, a menudo es relacionada con persistencia de patógenos en el área subgingival y con un deterioro en la respuesta del hospedero. Pacientes con periodontitis agresiva localizada, o con condiciones médicas predisponentes a la periodontitis podrían necesitar terapia antibiótica. Pacientes con infección periodontal aguda o severa (absceso periodontal, gingivitis/periodontitis ulceronecrotizante aguda) deberían ser medicados. Pacientes con gingivitis o periodontitis crónica estable, usualmente responden bien a la terapia mecánica periodontal y tienen pocos o ningún beneficio de la terapia antibiótica⁽⁵²⁾.

Numerosos trabajos han demostrado que el uso conjunto de antibióticos sistémicos puede mejorar los resultados clínicos del tratamiento inicial mecánico, y hacer predecible la eliminación de bacterias fuertemente asociadas con la enfermedad. Con este fin se han utilizado varios antibióticos para el tratamiento de las enfermedades periodontales, entre los que se encuentran las tetraciclinas, clindamicina, metronidazol y otros de la familia de las penicilinas^(5,53).

Varios regímenes de antibióticos sistémicos, incluyendo el uso de tetraciclina (Korn-Man & Karl, Bragd et al, Lindhe et al); amoxicilina (Magnussan et al, Haffajee et al); metronidazol (Lindhe et al, Joysten-Bechal et al, Van Oosten et al, Gusberti et al) o combinación de amoxicilina y metronidazol (Pavicic et al, Aberglundh et al, Winkel et al), han sido probados como terapia adjunta al tratamiento mecánico de pacientes con "dificultad" para tratarlos y en sujetos con formas agresivas de periodontitis, obteniéndose positivos resultados en el manejo de dichas patologías⁽⁵⁴⁾.

Metronidazol inhibe el crecimiento de bacterias anaerobias, sin embargo, según Chow et al⁽⁵⁵⁾, podría no afectar a ciertas bacterias tales como *Micromonas micros* (*P. micros*), *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens* y *Capnocytophaga*, que demostraron baja susceptibilidad *in vitro* a metronidazol. También se ha reportado que *Fusobacterium nucleatum* podría consumir o inactivar ciertos metabolitos hidroxilados del metronidazol y de esta forma proteger a otros organismos subgingivales que forman parte del "biofilm"⁽⁵⁶⁾.

En la Tabla II se puede apreciar una lista con las reacciones adversas más comunes de antibióticos usados en el tratamiento periodontal.

Tabla IILista de reacciones adversas de antibióticos usados en la terapia periodontal⁽⁵⁷⁾

Antibiótico	Reacciones adversas
Metronidazol	Náusea/vómito: 12%
Clindamicina	Diarrea: 7%
Penicilinas (amoxicilina)	Hipersensibilidad (rash): 5%, diarrea: 5%
Tetracyclinas (doxycyclines)	Fotosensibilidad
Azitromicina	Diarrea: 5%
Claritromicina	Diarrea: 3%
Quinolonas (ciprofloxacino)	Náusea/vómito: 5% Fotosensibilidad Riesgo de lesión en tendón de Aquiles (desórdenes con el ejercicio)

En cuanto a las características del hospedero, ocasionalmente se pueden desarrollar diversas reacciones adversas entre las cuales se ha documentado aquellas que aparecen en la Tabla II. Se podría desarrollar colitis pseudomembranosa después de una terapia con antibióticos de amplio espectro como la clindamicina y la ampicilina⁽⁵⁸⁾. Uno de trece pacientes con periodontitis refractarias en los cuales se prescribió clindamicina por 7 días experimentó colitis pseudomembranosa⁽⁵⁹⁾. Metronidazol exhibe una interacción con el alcohol, llamada efecto "disulfiram" en el cual, el paciente sometido a tratamiento con metronidazol no puede ingerir alcohol durante el tratamiento y un día después de él.

El uso de antibióticos en terapias periodontales acarrea potenciales riesgos para el periodonto, los cuales no han sido suficientemente estudiados. Además, pacientes con periodontitis crónicas, con historial de terapias recientes con penicilina demostraron elevados niveles de *Prevotella intermedia* resistente a la penicilina. También, se ha demostrado que, luego de terapias con tetraciclinas, la microbiota subgingival de pacientes con periodontitis contiene un número incrementado de bacterias resistentes a este antibiótico⁽⁶⁰⁾.

Por otra parte, las reacciones alérgicas causadas por drogas o sus metabolitos afectan a una importante proporción de la población mundial, de un 3% a un 10% está en riesgo de anafilaxia por penicilina. Del porcentaje anterior entre un 10% de la población, está en peligro la vida, y un 2% son casos fatales⁽⁶¹⁾.

Los efectos adversos causados por los antibióticos son causa principal de neutropenia y agranulocitosis. Los daños medulares son causados por altas dosis y largos periodos de administración. Neutropenia podrían ser causada por una toxicidad directa o por mecanismos inmunológicos. Cloranfenicol y β -lactámicos son ejemplos de neutropenia inducida por drogas. Pero, los mecanismos inmunológicos iniciales de neutropenia usualmente toman de una a dos semanas para ser expresados y no son dosis dependiente⁽⁶¹⁾.

Se ha reportado que pacientes que han recibido varios tratamientos con uno o más antibacterianos sistémicos albergan organismos oportunistas como bacilos entéricos, pseudomonas y levaduras, los cuales además, fueron resistentes a la terapia con tetraciclina, metronidazol y penicilina⁽⁶⁰⁾.

Rams et al⁽⁶²⁾, demostraron experimentalmente que luego de 3 semanas de una terapia con doxiciclina, puede resultar en un incremento temporal de bacilos entéricos, levaduras y *Staphylococcus* en sitios subgingivales, lo que podría indicar el riesgo del uso frecuente de tetraciclinas en el tratamiento periodontal.

La presencia de bacterias patogénicas resistentes a los antibióticos, resultado de un inapropiado uso sistémico de ellos, se ha convertido en un serio problema clínico de salud pública. Por lo tanto, se considera prioritario el desarrollo de modalidades alternativas para tratar las infecciones en la medicina moderna y esto incluye infecciones de la boca⁽¹²⁾.

b) Terapia antibiótica local

El concepto de antibioterapia local implica el depósito de la droga en el lugar afectado por el foco infeccioso. Está demostrado que los antibióticos de liberación local alcanzan mayores concentraciones que los de tipo sistémico. La cantidad de

droga liberada a menudo alcanza concentraciones que exceden los 1000µg/ml. Este nivel es considerado bactericida para la mayoría de las bacterias que presentan resistencia a las concentraciones sistémicamente liberadas. Igualmente importante, la posología local de un antibiótico exhibe un despreciable impacto en la microbiota residente en otras regiones del cuerpo. Además, no existen reacciones adversas ni efectos secundarios asociados a los antimicrobianos de administración local⁽⁶³⁾. El sistema de liberación local puede ser también utilizado para antibióticos que son demasiados tóxicos para ser administrados por vía sistémica y podría considerarse exitoso para microorganismos que están confinados a determinados focos infecciosos. Además, el no cumplimiento de las instrucciones en relación a la posología por parte del paciente, no es un factor significativo en los antibióticos de tipo local. Una desventaja obvia de la terapia sistémica, es que sólo una pequeña proporción de la dosis total alcanza la microbiota subgingival y el saco periodontal, mientras que el remanente es “perdido” en el resto del cuerpo⁽⁵¹⁾.

Se ha establecido que el principal desafío del modo local de administración de antibióticos es el de mantener una alta concentración de la droga sobre un área determinada por un prolongado período de tiempo. Con un simple enjuague o una irrigación supragingival, no es posible predecir que el agente químico llegará a las

profundidades del defecto periodontal. Los agentes que son llevados dentro del saco periodontal son arrastrados rápidamente hacia fuera por el fluido gingival. Se ha estimado que la vida media de la droga no adherida al saco es de alrededor de un minuto. Productos tales como geles, rápidamente desaparecen después de la instilación dentro del saco periodontal, a menos que cambien su viscosidad inmediatamente después de su colocación. Aquellos geles que son viscosos y/o biodegradables muestran una disminución exponencial de su concentración en el fluido gingival⁽⁵¹⁾.

Desde la perspectiva microbiológica, se ha considerado casi ideal la aplicación de antimicrobianos de liberación local para el tratamiento de sitios bien definidos. El debridamiento mecánico sirve para desorganizar y eliminar el biofilm bacteriano y, los antibióticos administrados localmente, al alcanzar concentraciones mayores que los de origen sistémico, permiten la eliminación de bacterias⁽⁶³⁾. Por ejemplo, doxiciclina, tetraciclina y minociclina, han sido individualmente incorporados con sistemas de liberación local continua, y comercialmente disponibles para los profesionales. Sin embargo, se ha aceptado muy lentamente su introducción e incorporación a la terapéutica periodontal, debido a que se requiere gran habilidad en el uso de estos materiales y, al mismo tiempo se requiere tratar múltiples sitios

periodontales afectados, lo que dificulta el método de aplicación. No obstante, el principal factor de su lenta incorporación, es la falta de interés por parte de los clínicos en el uso de éste⁽⁶³⁾. Se han reportado numerosos trabajos^(64,65), en los cuales se han realizado mediciones tanto clínicas (niveles de inserción y profundidad de saco) como microbiológicas, y se han obtenido mejores resultados que los logrados solamente con tratamiento periodontal mecánico sólo éste⁽⁶³⁾.

IV.- BIOCIDAS NATURALES

Simultáneamente al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha desplegado un gran interés de parte de los investigadores por estudiar sustancias naturales que posean algunas propiedades farmacológicas con efecto microbiano^(66,67).

Se debe destacar que los fármacos a base de derivados de productos naturales presentan una inmensa ventaja respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos siempre están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse biológicamente entre sí, de forma tal que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados⁽⁶⁸⁾.

En Estados Unidos se calcula que entre un cuarto y la mitad de todos los productos farmacéuticos que se venden, tienen un origen natural o han sido obtenido a partir de sustancias naturales, pero una escasa o nula cantidad son usados como antimicrobianos, desde la aparición de los antibióticos convencionales en la década de 1950⁽¹³⁾.

Fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de derivados de plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. En el ámbito odontológico, el importante

crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de programas preventivos y curativos ha estimulado la investigación, con el fin de avalar la actividad antimicrobiana de distintos derivados de plantas con el objeto de ayudar en el control de la placa bacteriana, y por consiguiente, en la disminución de la incidencia de caries dental y enfermedad periodontal⁽⁶⁶⁾.

Propolis

El propolis o propóleos es un compuesto resinoso y pegajoso, elaborado por la abeja *Apis mellífera*, a partir de exudados vegetales y mezclado con sustancias salivales. La palabra propolis deriva del griego *pro*, para o en defensa, y *polis*, la ciudad, es decir, “defensa de la ciudad (o la colmena)”⁽⁶⁹⁾.

El propolis es un producto de composición compleja. Las abejas *Apis mellífera* lo obtienen por adición de cera y secreciones salivales al material resinoso, gomoso o balsámico que recolectan de yemas, brotes y heridas de diversas plantas.

En la colmena, las abejas utilizan al propóleos con diversos fines tales como: cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena evitando su descomposición,

consolidar componentes estructurales, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes y evitar vibraciones⁽⁷⁰⁾.

Es larga la historia de la domesticación de las abejas por parte del hombre, quien se ha esmerado en la explotación de los productos fabricados por el insecto⁽⁷¹⁾. Es así que el uso del propóleos por parte del hombre data del año 300 a. de C., época en que ya era utilizado en la elaboración de remedios en la medicina tradicional. Sin embargo, es sólo en los últimos 50 años que se ha realizado la gran mayoría de los estudios tendientes a determinar la composición química, propiedades farmacológicas y en general, el uso farmacológico comercial de los preparados a base de propóleos⁽⁶⁹⁾.

Dentro de los productos apícolas, el propóleos se destaca por sus variadas y disímiles propiedades biológicas, lo que ha permitido que en los últimos años se haya incrementado su utilización en fitomedicina y en veterinaria. Es por lo tanto, una materia prima valiosa para la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos⁽⁷⁰⁾.

De acuerdo a numerosos estudios, se ha determinado que los constituyentes principales del propolis son las ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales y polen (además de impurezas mecánicas). La proporción de cada componente es variable y, depende tanto de la época de recolección como del origen vegetal de la resina, así como también de la raza de las abejas que lo produce⁽⁷⁰⁾.

a) Composición química y origen botánico

Marcucci⁽⁷¹⁾, señala que los compuestos en el propóleos sin procesamiento se originan de tres fuentes: exudado de plantas colectados por las abejas, productos metabólicos secretados por el insecto y, materiales introducidos durante la elaboración del producto.

El estándar de calidad vigente para propolis es la identificación botánica y las pruebas cromatográficas que corroboran la procedencia del propóleos⁽⁷¹⁾. Una técnica muy útil e informativa para determinar el origen botánico del propóleos, consiste en el análisis microscópico de los granos de polen y de fragmentos de hojas u otros restos dejados por las abejas durante la recolección del exudado de planta, los cuales son frecuentes contaminantes⁽⁷⁴⁾. La estructura de la exina, cubierta externa del polen, es característica de la especie de planta que le da origen y sirve para realizar un análisis taxonómico⁽⁷³⁾.

En general, revisiones sobre la composición química de propóleos dan cuenta de los siguientes grupos químicos: aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, amino ácidos, ácidos y ésteres aromáticos, chalconas y dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares⁽⁷²⁾.

El grupo más importante de compuestos encontrado en propóleos son los denominados fenoles, los cuales, constituyen más del 50% del peso total. Las propiedades médicas del propolis son atribuidas principalmente a la presencia de estas sustancias. Mas aún, la literatura apunta que algunas de las actividades pueden ser fuertemente relacionadas a los flavonoides, el principal compuesto fenólico del propolis⁽⁷⁵⁾.

Los flavonoides son pigmentos vegetales, sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, que generalmente exhiben brillantes colores como el de los pétalos de las flores. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son excitados por la luz UV, y se localizan en las células de las plantas verdes. Los flavonoides son usados por los botánicos para clasificación taxonómica. Ellos regulan el crecimiento de las plantas e influyen en otras células biológicas de diversas maneras. Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas proteasas, y además, destruyen algunos importantes protozoos⁽⁷⁶⁾. Poseen actividad antialérgica, anti-inflamatoria, antioxidante, atrapadora de radicales libres, antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. Además, se puede decir que aportan grandes beneficios para la salud al actuar como agentes quimiopreventivos en cáncer y

prevención de ataques al corazón. Su toxicidad a células animales es baja. Muchos profesionales están incrementando el uso de flavonoides puros para tratar muchas importantes enfermedades, debido a su comprobada habilidad de inhibir enzimas específicas, simular algunas hormonas y neurotransmisores, y eliminar radicales libres⁽⁷⁶⁾.

Se ha demostrado químicamente que los exudados de los árboles de tipo *Poplar* (*Populus alba*), son el principal recurso de propolis de zonas con clima mediterráneo como la zona norte de Europa, Sudamérica, y oeste de Asia (China). Menos comúnmente, en otras partes del mundo, especies como *Bétula*, *Ulmus*, *Pinus*, *Quercus*, *Sáliz*, y *Acacia* son utilizadas como recurso para el propolis⁽⁷⁷⁾.

Se ha demostrado además, que la composición química del género *Poplar* (*Populus*) incluye principalmente muchos tipos de flavonoides, flavonas y fenoles⁽⁷⁸⁾. En Uruguay por ejemplo, se identificaron 18 tipos de flavonoides, 4 ácidos aromáticos carboxilados y 11 ésteres de ácidos fenólicos. Dos de los flavonoides no estaban registrados en la literatura, pinobanksina y 2 metil-2-butenil ferulato. Los demás componentes fueron similares a los encontrados en Europa y China, por lo que se ha sugerido que el propóleos Uruguayo tiene el mismo origen vegetal que estas regiones⁽⁷⁹⁾. Por otro lado, en China se identificaron también nuevos componentes,

estos son hesperetina, ácido cinámico y ácido nicotínico, los cuales tienen importantes propiedades biológicas⁽⁸⁰⁾. Por su parte, en Turquía se han identificado como principales componentes de propolis provenientes de árboles *Poplar nigra*, los compuestos fenoles, flavonas y flavonoides como pinocembrina, pinobanksina, acetato de pinobanksina, crisina, galangina, ácidos fenólicos (cumárico, ferúlico y cafeico) y ésteres⁽⁸¹⁾.

A diferencia de los anteriores, en países con clima tropical como Brasil los principales componentes del propóleos son, terpenoides y prenilados, los cuales derivan de ácidos cumarínicos. Esta diferencia ha sido explicada por el diferente origen vegetal de este propolis, el cual, pertenece principalmente al género *Baccharis spp*^(82,83).

En Chile, en la región de ToroBayo, Valdivia, fueron aislados cinco flavonoides: galangina, crisina, pinocembrina, 3-metil galangina y 7 metil galangina. Casi todos ellos son característicos del género *Populus*, razón por la cual se estima que, en la recolección de propóleos, las abejas usan en proporción importante el exudado de las yemas de este género⁽⁸⁴⁾.

En la localidad de Colliguay, zona Central de Chile, se investigó el origen botánico y químico de un propóleos y se logró aislar siete tipos de flavonoides:

pinocembrina, acacetina, galangina, izalpinina, kaempferido, preniletina y diarylheptano trans-3,5-dihydroxy-1,7-diphenyl-hept-1-ene⁽⁸⁵⁾.

De acuerdo a estudios de propóleos de Chile se ha determinado que las siguientes especies son preferidas por la abeja: *Eucalyptus globulus* Labill, *Salix humboldtiana*, *Baccharis linearis*, *Buddleja plobosa*, *Peumus boldus*, provenientes de Santa Cruz, Quebrada Yaquil VI Región⁽⁸⁶⁾. Montenegro et al⁽⁷⁴⁾, han descrito dos sitios adicionales, encontrando la siguiente relación de plantas nativas e introducidas: *E. globulus*, *Escallonia pulvurulenta*, *Quillaja saponaria*, *Luma apiculata*, *Lithrea caustica* en Tanguao, VII Región. *Escallonia rubra*, *P. boldus*, *S. humboldtiana*, *Eucalyptus globulus*, *Quillaja saponaria* en Paine, Región Metropolitana. Muñoz et al⁽⁸⁷⁾, describe el siguiente repertorio de plantas: *E. globulus*, *S. humboldtiana*, *B. linearis*, *Q. saponaria*, *L. caustica*, *Galega officinalis* L., *Escallonia rubra*, *Hipochaeris radicata* L., *Colletia spinosas* Lam., *Trevoa trinervis* Miers correspondiente a la zona de Cuncumén. Por lo tanto, podemos decir que las abejas usan principalmente *Salix Humboldtiana* y *Eucalyptus globulus* en todos los sitios estudiados anteriormente y en otros como Santa Amalia, San Carlos, Loncolemu, Quillota, Corintios, Salto de Agua, y Tanguao), siendo otras especies (*Quillaja saponaria*, *Lithraea custica*,

Baccharis linearis y *Populus alba*) muy utilizadas como fuente de propóleos, aunque sólo en algunos de los sitios estudiados⁽⁸⁸⁾.

Dada la importancia de las especies vegetales nativas en el origen del propolis en la zona central de Chile, se ha considerado necesario realizar estudios comparativos entre regiones, de modo de establecer una red de información. Así mismo, los estudios sobre producción de propóleos pueden proveer información acerca de su calidad, de acuerdo al origen geográfico. Además, el análisis de los recursos vegetales comparados con el propóleos obtenido, puede proporcionar información adicional, útil para la estandarización de este recurso. Además, el conocimiento de las especies botánicas responsables de la producción de propóleos pueden aportar a la identificación de flora nativa para su uso potencial en la producción de drogas⁽⁸⁹⁾.

b) Características físico-químicas

El propolis es un material fuertemente adhesivo⁽⁷⁵⁾.

Chaillou et al⁽⁷⁰⁾, al analizar las propiedades físicas de una muestra de propolis de Argentina, determinaron lo siguiente:

1.- Características organolépticas: 100% presentó estructura homogénea, el 45% presentó un aspecto de trozos irregulares con brillo, el 30 % con poco brillo, y el resto trozos irregulares opacos. Los ensayos de consistencia mostraron que el 45% de las muestras eran poco blandas, el 40% duras y solamente un 15% blandas. Con respecto al color, el 65% de las muestras presentaron color marrón oscuro, un 20% marrón claro con tintes amarillos, un 10% con tintes castaños. El olor del 75% de las mismas fue resinoso, y el sabor de la totalidad de los propóleos fue picante.

2.- Punto de fusión: los valores encontrados para las diferentes regiones en estudio fluctuaron entre los 64°C y 89.5°C , con un promedio de 70°C.

3.- Impurezas mecánicas, ceras y resinas: el valor medio de impurezas mecánicas analizadas fue de 24,063%, contenido de cera promedio, de 30,048% y el porcentaje de resinas, 44,770%.

4.- Índices de oxidación, compuestos fenólicos y flavonoides: el rango de valores del índice de oxidación osciló entre los 4 y 18 segundos, el promedio fue de 9,8 segundos.

c) Actividad biológica

Las propiedades farmacológicas del propolis son bien conocidas y están bien documentadas. La literatura actual señala propiedades antibacterianas^(15,40,81,90-96), fungicidas^(15,97), antivirales⁽⁹⁸⁾, analgésicas⁽⁹⁹⁾, anti-inflamatorias^(91,100,101), antiulcerosas-cicatrizantes^(91,102), inmunoestimulantes⁽¹⁰¹⁾, anticancerígeno⁽¹⁰³⁾, antioxidantes⁽¹⁰⁴⁾ y anticariogénicas^(16,105-107).

Ensayos microbiológicos realizados con muestras de propóleos de diferentes sitios de la zona central de Chile, han mostrado una actividad heterogénea, y no se ha mostrado un patrón estable de actividad en las diferentes regiones geográficas, o durante las diferentes épocas del año. Sin duda, esto relata que la actividad del propóleos no solo está relacionada con el metabolismo de las especies botánicas, sino que también con su fenología, término que corresponde al estudio de los fenómenos biológicos acomodados a cierto ritmo periódico como la brotación, la maduración de los frutos y otros, mostrando que las propiedades específicas de los compuestos son incrementadas cuando el propolis de diferentes plantas es procesado en una fase específica de su desarrollo anual. Por lo tanto, esto se relaciona con las preferencias de las abejas para la elaboración del propolis en una estación específica del año. *Apis mellífera* puede detectar, seguramente cuáles son las plantas que se encuentran en un

adecuado estado de desarrollo y, de esta manera, determinar cuál especie usar. Varios componentes encontrados en el propóleo en otras partes del mundo, con ciertas propiedades protectoras, son volátiles, por lo que podrían ser detectados por las abejas a través de sus antenas o su sistema olfativo⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾.

Kujumgiev et al⁽¹¹²⁾ concluyen, que si bien cada uno de los componentes del propóleo puede presentar una buena actividad, ninguno de ellos individualmente presenta una actividad mayor que la mezcla de todos ellos formando el propóleo. Además, independiente del origen geográfico de la muestra, todos los propóleos presentan una actividad microbiológica bastante similar, por lo que propolis tiene una gran valor como la mezcla de compuestos que es, y no como una fuente para el descubrimiento de un nuevo y poderoso compuesto con actividad antibacteriana, antifúngica o antiviral⁽¹¹³⁾.

Las actividades biológicas de algunos de los más importantes componentes del propóleo son:

- **Pinocembrina:** actividad antibacteriana, fungicida, y utilidad como anestésico local⁽⁸⁵⁾.

- **Acacetina:** propiedades antiinflamatorias⁽¹¹⁴⁾. Además, recientemente se ha visto que es un poderoso inhibidor de enzimas presentes en el Citocromo P450 (pertenecientes

a la familia de las enzimas denominadas CYP1), que estarían involucradas en el metabolismo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos y hormonas. Por ello se especula que estas enzimas tendrían un rol importante en la aparición de algunos tipos de cáncer, más aún, que han sido detectadas en algunas muestras de tejidos cancerígenos⁽¹¹⁵⁾.

- **Conferido**: promisorio agente anticarcinogénico al inducir directamente quinona reductasa y otras enzimas protectoras, sin promover la activación de otros carcinógenos⁽¹¹⁶⁾.

- **Galangina**: es uno de los flavonoides que con mayor frecuencia se han encontrado en propóleos, presenta actividad antimutagénica, antioxidante, secuestrador de radicales libres y modulador de actividad de enzimas metabólicas, pero se le destaca principalmente por su capacidad antigenotóxica como un potente agente quimioprotector frente al cáncer⁽¹⁰³⁾. Además posee actividad antibacteriana⁽⁸⁹⁾.

Actividad biocida

En general, las propiedades antimicrobianas del propóleos han sido investigadas en los últimos años, sin embargo, es difícil comparar los resultados de diferentes estudios, debido tanto a las diferentes composiciones del propolis como a los diferentes métodos utilizados para su estudio.

En particular, la actividad biocida del propóleo estudiada frente a bacterias de interés en medicina, ha mostrado resultados alentadores *in vitro* e *in vivo*, ya que inhibió el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, tanto Gram positivo como Gram negativo. Sin embargo, se ha señalado que el efecto del propolis en contra de bacterias Gram positivo y levaduras, es mayor que sobre bacterias Gram negativo^(91, 93, 96). Stepanovic et al⁽⁹⁶⁾, utilizaron 13 tipos de propóleos de Serbia frente a 39 tipos de microorganismos, bacterias (Gram positivo y Gram negativo) y levaduras. Además, evaluaron sinergismo entre antibióticos y propolis. En ambos estudios, obtuvieron inhibición de crecimiento de bacterias y levaduras, y observaron sinergismo entre antibióticos y propolis, y entre antifúngicos y propóleos.

Se ha determinado⁽⁸¹⁾, que propóleos cuyo origen botánico es género *Populus*, y que contienen principalmente fenoles, flavonas y flavonoides en importante proporción (mayoritariamente pinocembrina y galangina), poseen una mayor actividad antimicrobiana que aquellos de origen botánico mixto que contienen derivados de ácidos diperténicos, ácidos grasos hidroxilados o cinamil cinamato.

Velikova et al⁽⁹⁴⁾, mediante difusión en agar, evaluaron la actividad antimicrobiana y la composición química de propóleos proveniente de Turquía frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, obteniendo resultados positivos para S.

aureus, para *E. coli* obtuvieron una menor inhibición de crecimiento. Sin embargo, Bosio et al⁽¹¹⁷⁾, mostraron que el método de difusión en agar no es conveniente para la comparación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de propolis, ya que la difusión del propolis es irregular.

En Brasil se realizó un estudio para investigar la actividad antibacteriana de propolis sobre diferentes bacterias orales como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces naeslundii*. En todas las especies estudiadas se obtuvo inhibición de crecimiento⁽⁹²⁾. En Chile, Guzmán⁽⁴⁰⁾, determinó *in vitro* la CIM de propóleos de la VIII región de Chile para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a determinadas concentraciones, logrando un valor de 800µg/ml. Fajuri et al⁽⁴⁰⁾, realizó un estudio también *in vitro*, pero mediante un test de difusión en agar, para probar la susceptibilidad de *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*, frente a propóleos chileno de la VIII región. En este estudio se encontró que todos estos microorganismos, excepto *Porphyromonas gingivalis*, fueron susceptibles al propóleos.

En cuanto a la actividad del propóleos sobre patógenos periodontales, Santos et al⁽⁹⁵⁾, evaluaron *in vitro* la susceptibilidad de *Prevotella Intermedia* y

Porphyromonas gingivalis frente al propóleos, obteniendo valores de CIM entre 64µg/ml y 256µg/ml. Gebara et al⁽¹⁴⁾, analizaron un grupo de bacterias aerobias y anaerobias, entre ellas algunas bacterias periodontopatógenas como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, y además, levaduras como *Cándida albicans*. Para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ellos obtuvieron una CIM de 1µg/ml; para *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, obtuvieron valores de CIM de 0,25µg/ml, y de 12µg/ml para *Cándida albicans*.

Estudios de susceptibilidad de bacterias cariogénicas frente a propolis, realizados tanto en Chile como en el extranjero, mostraron inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* con valores variables de CIM^(15, 42, 90, 92).

d) Mecanismo de acción

El mecanismo de acción antimicrobiano del propolis es complejo y no está completamente entendido. De acuerdo a Amoros et al⁽⁹⁸⁾ y Bonhevi et al⁽¹¹⁸⁾, la actividad en contra de los microorganismos está más relacionada al efecto sinérgico de los flavonoides (y otros fenoles), que a la acción de cada uno de ellos por separado. Estos descubrimientos están de acuerdo con lo que estudió Takaisikikuni y

Schilcher⁽¹¹⁹⁾, quienes observaron que la acción antibacteriana utilizaba varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática, y de la pared celular, bacteriolisis parcial, e inhibición de la síntesis de proteínas. Además se observó una inhibición de la división celular en presencia de propolis, y este hecho sugirió que el propóleo podría actuar inhibiendo la replicación del DNA a través de la RNA polimerasa e, indirectamente, afectando la división celular.

e) Uso de propolis en Odontología

Existen estudios⁽¹²⁰⁻¹²²⁾, que dan cuenta de las propiedades de inhibitorias del ácido cafeico y el fenil éster de ácido cafeico (derivados del propolis) sobre algunos componentes involucrados en respuestas inflamatorias periodontales, como las MMPs, las que participan además, en procesos tumorales. Aunque no existen estudios que relacionen directamente la inhibición que ejercería el propolis sobre las MMPs que se liberan en el periodonto, sí existen estudios analizando las interacciones que se producen entre estos dos elementos (propóleo y MMPs) en otras patologías del organismo como algunos tipos de cáncer^(121,123). Tae-Wook Chung et al⁽¹²²⁾ determinó que uno de los componentes del propolis, el ácido cafeico y su fenil éster de ácido

cafeico (derivado del ácido cafeico), es capaz de inhibir tanto la expresión del gen de la MMP-9 como la actividad catalítica de su enzima.

En un trabajo realizado por Al-Shaher et al⁽¹²⁴⁾ para investigar agentes antimicrobianos alternativos para conductos endodónticos, comparó la tolerancia de propolis e hidróxido de calcio *in vitro* sobre fibroblastos del ligamento periodontal y de la pulpa dental, logrando toxicidades diez veces menores para propóleos, con un 75% mas de viabilidad celular, en comparación con hidróxido de calcio.

En un ensayo *in vitro* realizado por Martin et al⁽¹²⁵⁾, probaron el propolis al 50% y al 100%, como medio para almacenar dientes avulsionados, comparándolos con los vehículos más aceptados hoy en día, como leche, solución salina balanceada y suero salino. El estudio se basó en el conteo de células viables del ligamento periodontal de las piezas avulsionadas. Los resultados mostraron significativamente que ambas concentraciones de propolis mantuvieron una cantidad mayor de células viables en comparación con los otros compuestos utilizados.

Quintana et al⁽⁹¹⁾, realizó un trabajo en el cual a diez pacientes con heridas sépticas faciales que presentaban gérmenes patógenos, secreciones, eritema, y en algún grado dehiscencia, les aplicó una tintura de propolis al 5% en etanol, sin administrar antibioterapia en ningún caso. Entre estos pacientes seis eran

traumatismos, tres correspondieron a exéresis de carcinomas basocelulares de piel, y a uno se le realizó una otoplastia. Los resultados mostraron que, para aquellos que presentaron gérmenes Gram positivo, el periodo de curación de las heridas fue de siete días. Para un solo paciente, que presentó bacterias Gram-negativo, el tiempo de resolución de la injuria fue de 13 días.

En Cuba se utilizó una pasta dental a base de propóleos, con la cual se realizaron ensayos en un grupo de niños, analizándose la variación en el índice de COPD. Se logró una disminución significativa en el índice de caries⁽¹⁰⁷⁾.

Rosalen et al⁽¹⁰⁵⁾, observaron que la aplicación de extracto de propolis en molares de ratas redujo la severidad de lesiones cariosas. Ikeno et al⁽¹⁰⁶⁾, demostró que al incluir un extracto etanólico de propóleos, proveniente de China, en agua, a una concentración de 1mg/ml, la incidencia de caries disminuyó de 62,2% a 56,2%.

En un estudio clínico que se realizó para investigar el efecto del propolis en la reducción de placa bacteriana, el cual se realizó durante 3 días, el índice de placa se redujo en un 44,7% aproximadamente después del tratamiento, comparado con el placebo. Además, el colutorio redujo la concentración de polisacáridos insolubles en la placa en un 61,7% comparado con el placebo⁽¹²⁶⁾. Se ha determinado además, que el propóleos es capaz de inhibir *in vitro* la enzima glucosiltransferasa. Esta enzima es

producida por el *Streptococcus mutans* y constituye un factor de virulencia asociado con caries dental. Glucosiltransferasa cataliza la formación de glucanos solubles e insolubles a partir de sacarosa, y contribuye significativamente a la formación de la matriz de polisacáridos de la placa dental⁽¹²⁶⁾.

f) Reacciones adversas

Las reacciones adversas a la aplicación local de propolis son escasas y se refieren generalmente a reacciones alérgicas de hipersensibilidad de tipo dermatitis de contacto⁽¹²⁷⁾. Se han descrito hasta la fecha un total de 250 casos de alergias por dermatitis de contacto al propóleo. Los reportes generalmente se describen con dermatitis en las zonas palmares y dedos, correspondiente a la manipulación de partes de la colmena que contienen propolis, o bien, se han visto reacciones alérgicas en la mucosa oral, mucositis orales agudas con ulceraciones, debido a la ingesta de grageas o gotas de propolis⁽¹²⁸⁾.

El principal agente sensibilizante descubierto en la composición de propolis corresponde a 3-metil-2-butenil cafeato y feniletil cafeato. Posiblemente existan otros alérgenos no descubiertos a la fecha⁽¹²⁹⁾.

En base a los antecedentes presentados, *Porphyromonas gingivalis* es considerada como una de las especies periodontopatógenas más agresivas de acuerdo a los mecanismos de virulencia que posee y ha sido asociada fuertemente con periodontitis (complejo rojo de Socransky). Es por esto que el objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro* la concentración mínima inhibitoria (CIM) de propolis, sobre el crecimiento de aislados de *Porphyromonas gingivalis*, obtenidos de muestras de pacientes chilenos con periodontitis.

HIPÓTESIS

El propolis chileno de la V región, marca Apiherbal®, presenta actividad biocida frente a *Porphyromonas gingivalis*, y ésta es cuantificable mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima, *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Establecer mediante la determinación *in vitro de* la concentración inhibitoria mínima (CIM), que el propolis chileno tiene actividad biocida frente a *Porphyromonas gingivalis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Establecer el origen botánico del propolis chileno utilizado en este estudio.
- 2.- Obtener aislados puros de colonias de *Porphyromonas gingivalis*, a partir de muestras de placa dental subgingival de pacientes chilenos con periodontitis crónica o agresiva.
- 3.- Identificar morfológica, bioquímica y fisiológicamente los aislados.

4.- Establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) del propolis sobre el crecimiento de cada uno de los aislados de *Porphyromonas gingivalis* mediante ensayos de dilución en agar.

5.- Evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de diferentes concentraciones del alcohol utilizado como solvente del propolis, sobre el crecimiento *in vitro* de *Porphyromonas gingivalis*.

MATERIALES Y MÉTODO

1.- Pacientes

Para este estudio se obtuvieron muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva, entre quiénes asistían a la asignatura de Clínica Integral del Adulto, a la Clínica Fisher y a la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Patología Facultad de Odontología, Universidad de Chile, previa firma de un consentimiento informado (ver anexo).

Se seleccionaron pacientes con presencia de signos clínicos de inflamación causada por periodontitis como sangramiento gingival al sondaje, enrojecimiento de la encía, aumento de volumen, y además, presencia de saco periodontal con pérdida de inserción y movilidad dentaria, con o sin enfermedades sistémicas. Se muestrearon sacos con profundidades mayor o igual a 4mm. No se consideraron aquellos pacientes que estuvieron en tratamiento periodontal previo, aquellos que hubiesen ingerido antibióticos dentro de los últimos 6 meses, y pacientes que hubiesen usado colutorios.

2.- Toma de muestra de placa dental subgingival

La toma de muestras se realizó según protocolo descrito por Slots⁽¹³⁰⁾. Brevemente, una vez seleccionados los dientes para tomar las muestras, con una tórula de algodón se eliminó cuidadosamente la placa supragingival de la zona. Se secó la zona con algodón estéril. Luego se procedió a tomar la muestra con conos de papel de endodoncia número 30, colocándolos cuidadosamente dentro del saco periodontal, procurando no perforar el fondo, durante 15 a 20 segundos. Al retirar los conos se introdujeron rápidamente en tubos que contenían 2ml de medio de transporte estéril RTF a una temperatura de 4°C.

Éstas fueron al laboratorio de microbiología para ser procesadas dentro de un plazo máximo de 3h posteriores a la toma.

3.- Siembra y cultivo de las muestras

a. Medio de cultivo

El agar Columbia se preparó según las indicaciones del fabricante. El medio se colocó en baño de agua a una temperatura de 45-50°C durante 30 minutos, y se esterilizó en autoclave dejándose enfriar en baño de agua hasta 45-50°C. Bajo

campana de flujo laminar, se incorporó sangre de cordero al 5% final (v/v), y 3ml de hemina-menadiona al medio estéril, para obtener una cantidad de 300ml de medio total; luego se dispensó aproximadamente 20ml de medio por placa.

b. Dilución y siembra de las muestras

a) Se prepararon diluciones seriadas de la muestra en tubos Eppendorf, obteniéndose suspensiones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , en PBS (solución de Buffer fosfato) pH 7,4.

b) Para sembrar las muestras, se tomaron 100 μ l de las diluciones -3 y -4, y se depositaron en placas de agar Columbia (suplementado con 5% de sangre de cordero y hemina-menadiona) La muestra se esparció en la superficie del agar con un asa de Drygalsky.

c. Cultivo

Las placas sembradas se incubaron en Jarra hermética conteniendo un generador de anaerobiosis, (Anaerogen, Oxoid), por 5 días a 36°C.

4.- Identificación y Aislamiento de colonias de *P.gingivalis*

a. Identificación

La identificación de colonias de *P.gingivalis* se realizó mediante análisis de la morfología colonial (macroscópico) y de la morfología celular (microscópico). Las colonias de *P.gingivalis*, cuando crecen en una superficie de agar sangre, son inicialmente blanquecinas para luego colorearse crema. A los 4 a 8 días, estas colonias obscurecen tornándose de color rojo profundo, verdoso o negro, desde su borde hacia el centro, lo cual se correlaciona con la concentración de protoheme en la pared celular⁽¹⁰⁾. Así, de acuerdo a las características coloniales descritas para *P.gingivalis*, y mediante observación bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000C, Zeiss), colonias negras, verdosas o pardas muy oscuras, redondas, convexas, brillantes y lisas, fueron sembradas con técnica de aislamiento en agar Columbia. Estas colonias, a diferencia de otras especies bacterianas pigmentadas, no fluorescen espontáneamente bajo luz UV de onda larga (360nm), prueba que también se usó para su identificación⁽¹³⁵⁾.

Además, para la identificación se utilizó un Kit rápido de identificación bioquímico (Kit Rapid ANA II, Remel) que constaba de 18 pruebas bioquímicas, para

identificar especies de bacilos anaeróbicos estrictos, el cual permitió confirmar la identidad de 35 aislados bacterianos.

El análisis morfológico de las células que formaban la colonia se realizó mediante frotis y tinción de Gram. Observadas al microscopio (Zeiss), con lente de inmersión, las células de *Porphyromonas gingivalis* aparecen como bacilos cortos Gram negativo.

b. Aislamiento y resiembra

Los aislados de *P.gingivalis* se mantuvieron mediante resiembras cada 5 días y posterior al cultivo, en las mismas condiciones ya descritas, mientras duró el ensayo. Esto, con el fin de probar la susceptibilidad al propolis de todos los aislados en forma simultánea.

5.- Origen del propóleos

a. Preparación del propolis

El propolis, cuyo nombre comercial es Apiherbal®, fue recolectado el día 21 de septiembre del 2005 de los apiarios del señor Enrique Saldiaz, Técnico Microbiólogo Industrial y de Alimento, y, empresario apícola. Las coordenadas de la

parcela son, 33° 23' 13,57 S; 71° 07' 26,37" W, entre los cerros: Morro y El Oreganillo por el Norte, y por el Sur, cerro El Parrón, zona cercana a la comuna de Curacaví, V región de Chile.

Se utilizó propóleos obtenido de trampas, y de raspado de cajón de la colmena (50% y 50%, respectivamente).

El señor Enrique Saldiaz realizó el preparado de propóleos usando una solución alcohólica al 55%, para diluir el propolis, mezclando ambas, en una relación de 1:2 (30g de propóleos y 60g de alcohol al 55%). La mezcla, se mantuvo en un lugar oscuro, calentando una vez por día entre 34°C y 38°C, y agitando. Este proceso denominado "maceración" se realizó durante 7 días. Luego fue filtrado y envasado para su utilización posterior.

b. Determinación del origen botánico del propóleos

El propolis fue transportado en bolsa plástica sellada y estéril al laboratorio de Botánica del Departamento de Ciencias Vegetales de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, de la Pontificia Universidad Católica de Chile. En el laboratorio, el Sr. Prof. Rodrigo Pizarro (Licenciado en Biología-Palinología) en conjunto con la

Sra. Prof. Gloria Montenegro, Licenciada en Biología, Botánica y Fitoquímica, realizaron íntegramente el procedimiento para la identificación del origen botánico de las muestras de propolis, usadas para estudiar su actividad biocida. Se comenzó con la preparación del compuesto para su análisis, para lo cual se pesaron 10g de propóleos en bruto, luego se agregaron 50ml de alcohol etílico de 96°, dejando disolver la mezcla por 96h, calentando cada 24h a 40°C. Posteriormente, la mezcla se filtró para separar el residuo sólido de la fracción alcohólica. Para la obtención del compuesto final, a partir del residuo sólido, y su posterior análisis, se usó el método de Gómez-Ávila⁽¹³¹⁾. En breve, se tomaron 2g del residuo semisólido de propóleos y se resuspendieron en 2ml de etanol de 96°, luego se colocó una gota de esta suspensión en un portaobjetos, agregando una gota de solución de Carberla (solución hidroalcohólica de fuccina diamante), que tiñe específicamente los granos de polen. Además, se agregó una gota de gelatina glicerinada derretida o de Entellan o Eukitt, y se cubrió con un cubreobjetos. Se dejó secar por algunos minutos y quedó lista para ser observada al microscopio óptico. Del total de la muestra se elaboraron 5 preparaciones para ser observadas en microscopio con aumento de 40x. En cada preparación se contaron los granos de polen encontrados en 10 campos visuales escogidos al azar. Debiéndose lograr un total de aproximadamente 1200 granos de

polen contados, para luego calcular los porcentajes de participación de cada especie a partir de este total. La identificación de los pólenes se realizó por comparación con una colección de preparaciones hechas a partir de anteras de flores (palinoteca), y también con la siguiente bibliografía: Heusser et al⁽¹³²⁾, Montenegro G.⁽⁷⁴⁾, Hodges D.⁽⁷⁴⁾, y Erdtman G.⁽¹³³⁾

6.- Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del propolis frente a aislados de *Porphyromonas gingivalis*, mediante el método de Dilución en Agar.

Este ensayo experimental se realizó en el laboratorio de Microbiología, Departamento de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Este estudio de susceptibilidad al propolis, se inició con 35 aislados de *Porphyromonas gingivalis*.

a. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Este ensayo se realizó en agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero, hemina y menadiona, y adicionado con las diluciones de propolis usadas.

El agar Mueller-Hinton se preparó según las indicaciones del fabricante, y se utilizó de acuerdo a las recomendaciones de la NCCLS, para la realización de antibiogramas. Una vez autoclavado, se dejó enfriar en baño termostático hasta una temperatura entre 45°C y 50°C. Luego, en gabinete de bioseguridad clase IIA (Filtro/Met), se depositaron en tubos estériles, 14ml del agar fundido, 1ml de sangre de cordero (5% final), 0,2ml de Hemina-Menadiona y 5ml de propolis a una concentración adecuada para alcanzar la concentración final requerida en la placa de agar. La concentración del propolis del fabricante utilizada fue de 333mg/ml, y de alcohol es de 55%v/v.

En la Tabla III se presenta la composición de los tubos de 5ml de las soluciones de propolis utilizadas.

Tabla III
Preparación de soluciones de propolis para la
determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

	Propolis fabricante (ml)	Suero fisiológico (ml)	Alcohol solución final (%)	Propolis solución final (mg/ml)
Tubo 1	5	0	13,75	83,2
Tubo 2	2,5	2,5	6,875	41,6
Tubo 3	1,75	3,25	0,55	20,8
Tubo 4	0,75	4,25	0,23	10,4
Tubo 5 (Control)	0	5	0	0
Tubo 6 (Control)	0	5	0	0
Tubo 7 (Control)	0	5	0	0

El contenido de cada tubo (20ml) se homogenizó y se vació rápidamente en una placa de Petri estéril. Se prepararon 7 placas para el ensayo, las que se incubaron a 36°C durante la noche para comprobar su esterilidad.

Para los ensayos de CIM, los aislados de *P.gingivalis* debían encontrarse en crecimiento exponencial, por lo cual se usaron cultivos de 72h a 96h en agar Columbia.

El inóculo de cada aislado de *Porphyromonas gingivalis* se estandarizó preparándose para cada uno, una suspensión en RTF con una turbidez similar al estándar 0,5 de McFarland, la que equivale a una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

De la suspensión de cada aislado, se tomó una alícuota de 5µl y se dispensó en posición equivalente, en cada una de las 7 placas preparadas con las diferentes diluciones de propolis. Con este fin se confeccionó un replicador manual consistente en un patrón de plástico (autoclavable) que encajaba exactamente sobre la placa de agar, y que contenía una serie de orificios a través de los cuáles se podía depositar, de acuerdo a un cierto orden, la alícuota de cada suspensión bacteriana. Después del período de incubación se podía, por lo tanto, conocer la ubicación exacta de cada

aislado en la superficie del agar y, de esa manera, establecer si había crecido o no, en las diferentes diluciones de propolis (Fig. 2).



Figura 2: Replicador manual utilizado en el estudio de CIM para el depósito de alícuotas de la suspensión de *Porphyromonas gingivalis*

Placas control, sin propolis incorporado, al inicio y al final de la serie, se usaron como controles de viabilidad. Después de sembrar los 35 aislados, las placas se mantuvieron semiabiertas por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, para permitir el secado total de los inóculos. Luego, fueron incubadas a 36°C en anaerobiosis por 96h. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue registrada como el valor de la menor concentración de propolis que inhibió completamente el desarrollo bacteriano, en las condiciones de este estudio. El desarrollo de un número menor o igual a 1

colonia, o una tenue película causada por el depósito del inóculo, se consideró sin crecimiento.

b. Evaluación de la actividad inhibitoria del alcohol utilizado como solvente del propolis

Este ensayo se realizó para establecer el efecto del etanol utilizado como solvente del propolis, sobre el crecimiento de *P.gingivalis*. Se utilizaron 2 aislados representativos de las 35 colonias, y los medios Columbia y Mueller Hinton. Las concentraciones de alcohol utilizadas se eligieron de acuerdo al porcentaje que alcanzaba este vehículo al diluir el propolis. Estas fueron: 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% y 0.2%.

Cada uno de los dos aislados fue sembrado en césped, en los medios ya descritos. Luego se realizó un “espoteado”, dispensando 5µl de cada concentración de alcohol, sobre el césped bacteriano recién sembrado. Las placas fueron cultivadas en anaerobiosis a 36°C por 96h, y luego se determinó crecimiento o ausencia de él.

7.- Análisis estadístico de los resultados

El análisis melisopalinológico (origen botánico) de la muestra de propolis fue realizado a través de un análisis de proporción, con valores de confianza del 95%, asignándole valores mínimos y máximos.

La significancia de la presencia o ausencia de crecimiento de los aislados de *Porphyromonas gingivalis*, a las diferentes diluciones de propolis probadas, se realizó mediante un análisis estadístico de regresión lineal y correlación de Pearson, en el cual se tomó el crecimiento de los aislados de *P.gingivalis* como variable dependiente, y la concentración de propolis como variable independiente⁽¹³⁶⁾.

RESULTADOS

I.- Determinación del origen botánico del propolis chileno usado en este estudio

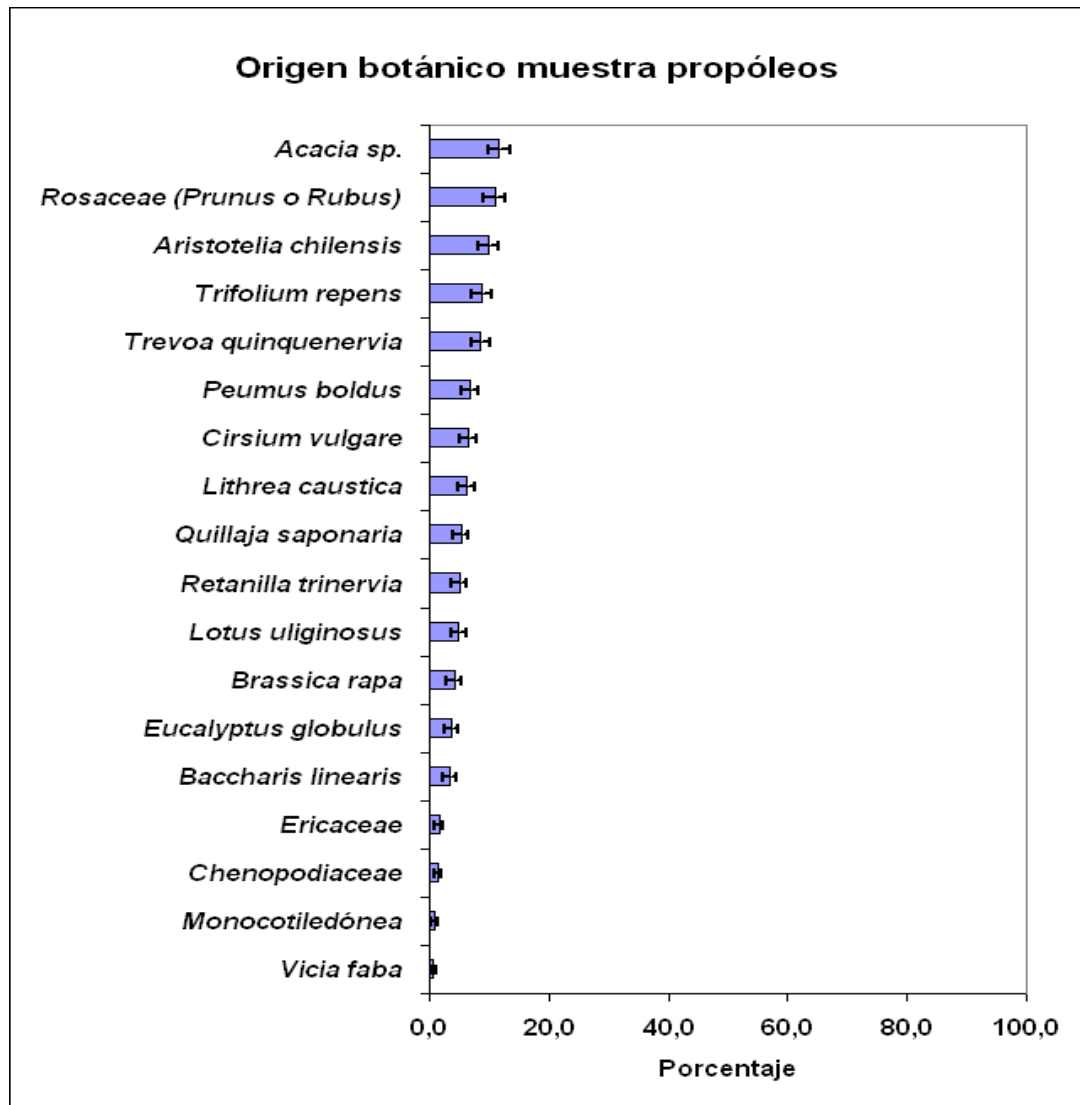
En el Gráfico 1 se muestra, en porcentajes, la composición botánica de una muestra del propolis utilizado en este estudio. Se puede observar que no hay una predominancia de una especie botánica en particular sino que existe más bien una heterogeneidad en el origen de las muestras, lo que demuestra la gran variedad de recursos que utiliza la abeja *Apis mellifera* en la realización del propóleos. Se encontró una variedad de especies introducidas y otras nativas. Las especies introducidas encontradas en mayor proporción fueron *Acacia sp (aromo)*, *Rosaceae Prunus* o *Rubus (durazno o mora, respectivamente)*, *Trifolium repens* (trébol); y *nativas*, compuestas por *Aristotelia chilensis* (maqui), *Trevoa quinquenervia* (tralhuén), *Retanilla trinervia* (tevo) y, *Peumus boldus* (boldo).

De la familia de las *Rosaceae*, en su género *Prunus*, no se pudo identificar la especie a la cual correspondía, ya que este género presenta igualdad de morfología polínica en sus diferentes especies. No obstante, se puede deducir, por la zona geográfica de los recursos, que las especies del género *Prunus* responsables de este

tipo de pólenes, serían las habituales para este sector hortofrutícola, es decir, duraznos, ciruelos y almendros.

También se identificó en el origen de este propolis, al género *Rubus* (mora).

Gráfico 1
Composición botánica, en porcentaje, de la muestra de propolis



En las Figuras 3 y 4, se observan las diferencias que existen en la morfología polínica de las especies botánicas. Esta característica es utilizada para la identificación en el análisis melisopalinológico.



Figura 3: Grano de polen de *Acacia sp.* observado con microscopio óptico (40x). Se observa forma de mórula que caracteriza a esta género botánico

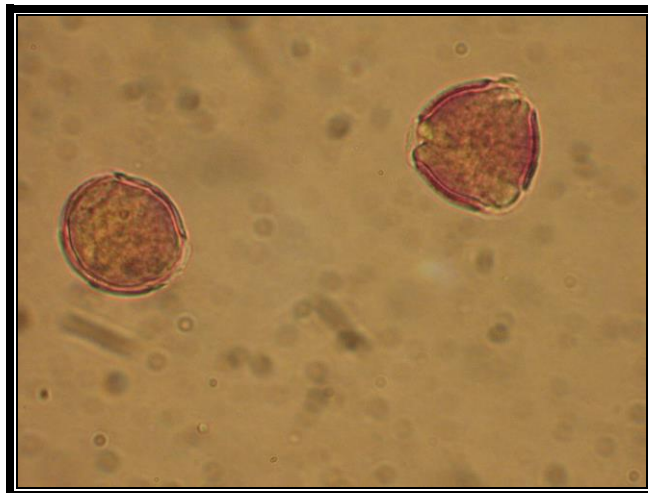


Figura 4: Gametofito masculino o polen del género *Rosaceae* (*Prunus* o *Rubus*). Se puede apreciar la morfología diferente a *Acacia sp.* (Fig. 3) en la exina o capa externa. Aumento 40x

Tabla IV

Porcentaje de los diferentes tipos botánicos encontrados en la muestra de propolis, aplicando el test estadístico de análisis de proporción

					Rango 95% de confianza	
Especie	Nombre Común	Nº granos	Porcentaje	+/-	Mín.	Máx.
<i>Vicia faba</i>	Haba	7	0,612	0,452	0,160	1,065
Monocotiledónea		9	0,787	0,512	0,275	1,300
Chenopodiaceae		16	1,400	0,681	0,719	2,081
Ericaceae		18	1,575	0,722	0,853	2,297
<i>Baccharis linearis</i>	Romerillo	39	3,412	1,052	2,360	4,465
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	43	3,762	1,103	2,659	4,865
<i>Brassica rapa</i>	Yuyo	47	4,112	1,151	2,961	5,263
<i>Lotus uliginosus</i>	Alfalfa chilota	56	4,899	1,251	3,648	6,151
<i>Retanilla trinervia</i>	Tevo	58	5,074	1,272	3,802	6,347
<i>Quillaja saponaria</i>	Quillay	60	5,249	1,293	3,956	6,542
<i>Lithrea caustica</i>	Litre	71	6,212	1,399	4,812	7,611
<i>Cirsium vulgare</i>	Cardo	73	6,387	1,418	4,969	7,804
<i>Peumus boldus</i>	Boldo	77	6,737	1,453	5,284	8,190
<i>Trevoa quinquenervia</i>	Tralhuén	98	8,574	1,623	6,951	10,197
<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco	101	8,836	1,645	7,191	10,482
<i>Aristotelia chilensis</i>	Maqui	112	9,799	1,724	8,075	11,522
Rosaceae (<i>Prunus</i> o <i>Rubus</i>)	Durazno o Mora	125	10,936	1,809	9,127	12,745
<i>Acacia sp.</i>	Aromo	133	11,636	1,859	9,777	13,495
		1143				

Según la tabla IV, los porcentajes de cada especie vegetal encontrada en la muestra de propolis poseen un rango de confianza de un 95%, con un valor mínimo y máximo. Esto quiere decir que hay un 95% de certeza de que los valores de porcentaje de cada una de las especies botánicas, se ubiquen entre los valores de confianza mínimos y máximos, existiendo un 5% de posibilidades de que estén fuera de dicho rango.

II.- Obtención de aislados de *Porphyromonas gingivalis*

De las muestras de placa subgingival cultivadas en placas de agar Columbia, se pudo aislar e identificar 35 aislados de *Porphyromonas gingivalis*. Colonias pigmentadas, convexas, redondas, brillantes, típicas de esta especie bacteriana se muestran en la Fig. 5.

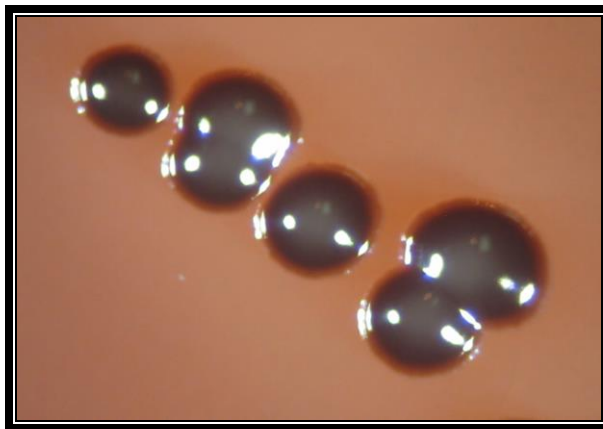


Figura 5: Grupo de colonias de *Porphyromonas gingivalis*

En la figura 6 se observa la lupa estereoscópica que se utilizó para realizar las siembras y la identificación morfológica colonial de los diferentes aislados bacterianos.



Figura 6: Lupa estereoscópica (Stemi 2000C, Zeiss) para el análisis colonial de los aislados bacterianos, y placa de agar Columbia con desarrollo bacteriano

El análisis de la morfología celular de los aislados, mediante frotis y tinción Gram, mostró la presencia de bacilos cortos (cocobacilos) Gram negativo (Fig. 7).

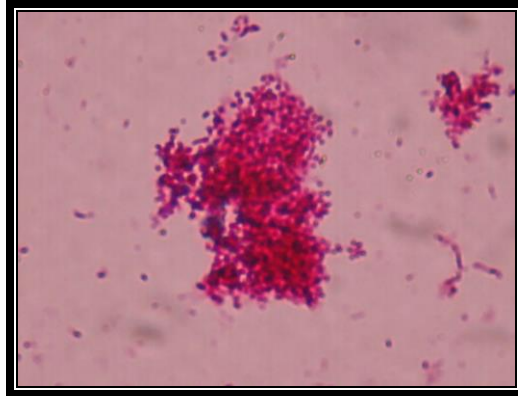


Figura 7: Frotis y tinción Gram de células (bacilos) de *P.gingivalis*

La detección de fluorescencia espontánea bajo luz UV de 360nm, permitió diferenciar colonias de *Porphyromonas gingivalis*, que no fluorescen, de colonias de *Prevotella intermedia/nigrescens*, que muestran fluorescencia roja, en las mismas condiciones. En la figura 8 se aprecia la fluorescencia de color rojo de un aislado de *Prevotella intermedia/nigrescens* tubo 2 (derecha), en contraste con la no detección en el tubo 1 (izquierda) correspondiente a *P.gingivalis*, ambos resuspendidos en metanol. En la figura 9 se muestra el visor de luz UV con cámara oscura, que se usó para la visualización de colonias pigmentadas que emitían o no fluorescencia espontánea bajo luz UV

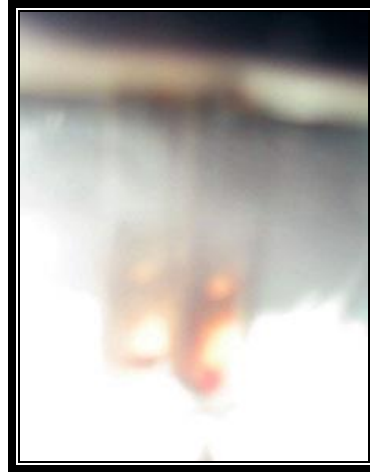


Figura 8: Se aprecia fluorescencia positiva (rojo) de *Prevotella intermedia/nigrescens* (derecha), y negativa (izquierda), correspondiente a *P.gingivalis*



Figura 9: Visor de luz UV con lámpara UV de 360nm y cámara oscura, el cual permite observar e identificar las colonias que son capaces de emitir fluorescencia bajo luz UV

Mediante el Kit rápido de identificación bioquímico (Kit Rapid ANA II, Remel) se pudo confirmar la identidad de los 35 aislados bacterianos (Fig. 10), seleccionados para este estudio.



Figura 10: Pruebas bioquímicas del Kit rápido de identificación de bacilos anaerobios (Kit Rapid ANA II, Remel)

III.- Determinación de la CIM de propolis frente a *P.gingivalis*

La CIM de propolis se registró como el valor de la menor dilución que inhibió completamente el desarrollo de *P.gingivalis*. El desarrollo de una sola colonia en la zona del inóculo no se consideró positivo⁽¹⁴⁰⁾.

De los 35 aislados probados, sólo 21 crecieron en las placas de control de viabilidad (sin propolis), por lo cual los 14 restantes no fueron considerados.

Colonias con pigmentación clara fueron resembradas y cultivadas por 5 a 7 días para verificar la pigmentación definitiva y, en todos los casos (colonias de color crema amarillento, amarillo verdoso, hasta un café pálido), se recuperó la pigmentación oscura.

En la Tabla V se presenta el efecto de las diferentes concentraciones de propolis sobre el crecimiento de los aislados de *Porphyromonas gingivalis*.

Tabla V
Desarrollo de aislados de *Porphyromonas gingivalis* a diferentes concentraciones de propolis

Aislado Nº	Concentración de propolis (mg/ml)						Control 3 5% CO2
	Control 1	10,4	20,8	41,6	83,2	Control 2	
1	+	-	-	-	-	+	-
2	+	+	+	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	+	-
4	+	-	-	-	-	+	-
5	+	+	+	+	-	+	-
6	+	+	+	+	-	+	-
7	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	-	-	-	+	-
9	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	-	-	-	+	-
11	+	-	-	-	-	+	-
12	+	+	+	+	-	+	-
13	+	+	+	+	-	+	-
14	+	+	+	+	+	+	-
15	+	+	-	-	-	+	-
16	+	+	+	+	-	+	-
17	+	+	-	-	-	+	-
18	+	+	+	-	-	+	-
19	+	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	-	-	+	-
21	+	+	+	+	+	+	-

+: desarrollo bacteriano

-: ausencia de desarrollo o hallazgo de un número ≤ 1 colonia

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla V se observa que en los controles 1 y 2 sin propolis de los 21 aislados de *P.gingivalis* hubo desarrollo normal.

En el control 3 de contaminación al 5% de CO₂, no hubo desarrollo de *P.gingivalis* ni de otros tipos bacterianos.

De acuerdo a la Tabla V, la CIM de propolis para un 75% de los aislados de *Pgingivalis* correspondió a 83,2mg/ml.

El efecto de las diferentes concentraciones de propolis frente a *Porphyromonas gingivalis* se encuentra resumido en las Tablas VI y VII, y expresado como puntos de dispersión en los Gráficos 2 y 3.

Tabla VI
Relación entre concentración de propolis y número de aislados de *P. gingivalis* con y sin desarrollo

Nº aislados	Concentración propolis			
	10,4mg/ml	20,8mg/ml	41,6mg/ml	83,2mg/ml
Desarrollo (-)	4	8	11	16
Desarrollo (+)	17	13	10	5

En la Tabla VII se expresan en porcentajes, los mismos resultados anteriores.

Tabla VII
Porcentaje de aislados de *P.gingivalis* con y sin desarrollo a las diferentes concentraciones de propolis

Aislados %	Concentración propolis			
	10,4mg/ml	20,8mg/ml	41,6mg/ml	83,2mg/ml
Desarrollo (-)	19,04	38,09	52,38	76,19
Desarrollo (+)	80,96	25,09	47,62	23,81

Gráfico 2

Número de aislados de *Porphyromonas gingivalis* desarrollados en relación a las diferentes concentraciones de propolis

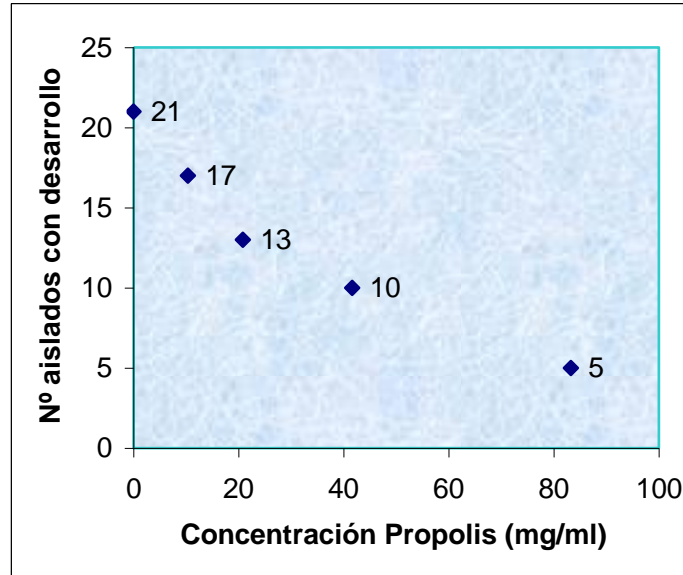
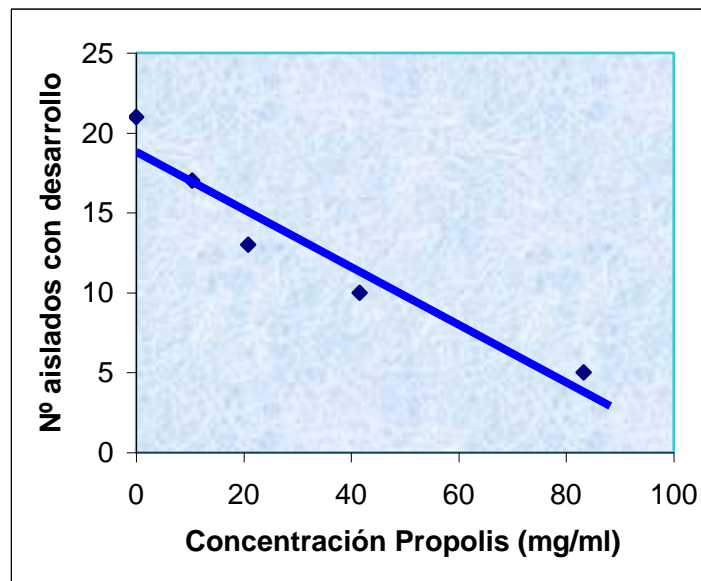


Gráfico 3

Línea de tendencia o regresión lineal entre el número de aislados de *P.gingivalis* desarrollados en relación a las diferentes concentraciones de propolis



La ecuación de la recta para el ensayo fue: $y = -0,1803 X + 18,825$.

El coeficiente de correlación de Pearson (r) obtenido para estos datos fue $r = -0,959$, indicando una relación inversa alta entre la variable dependiente (crecimiento de los aislados de *P.gingivalis*) y la variable independiente (concentración de propolis). A su vez, el coeficiente de determinación ($r^2 = 0,9203$), igual a 92%, indicó que la variación en el desarrollo de *P.gingivalis* podía explicarse fuertemente por la variación en la concentración de propolis.

IV.- Determinación del efecto del alcohol sobre el desarrollo de *Porphyromonas gingivalis*

En la tabla VIII se muestra el resultado de probar el efecto de diferentes concentraciones de alcohol sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*, tanto en agar Columbia (medio de referencia para *P.gingivalis*) como en agar Mueller-Hinton, ambos medios suplementados con sangre y hemina-menadiona.

Tabla VIIIEfecto del alcohol sobre el desarrollo de los aislados de *Porphyromonas gingivalis*

		Concentración de alcohol (%)														
		0,2	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
N° aislados Columbia	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
N° aislados Mueller - Hinton	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+: indica desarrollo

-: indica ausencia de desarrollo o hallazgo de un número ≤ 1 colonia

Se puede observar en la Tabla VIII, que concentraciones de alcohol entre 40% y 65% inhibieron el desarrollo de *Porphyromonas gingivalis* en ambos medios de cultivo. Por el contrario, concentraciones de alcohol entre 35% y 0.2% no inhibieron el crecimiento bacteriano.

DISCUSIÓN

I.- Determinación del origen botánico del propolis

La identificación de pólenes por el método melisopalinológico, permite una aproximación muy cercana al origen botánico del propolis aunque hay ciertos autores que consideran que este sistema de identificación aplicado al propolis no es cien por ciento confiable debido a que el polen se produce en sectores anatómicos de la planta diferentes del que se extraen las resinas para el propolis, zonas de yemas y heridas en plantas y árboles. De acuerdo a este método, el origen botánico del propolis utilizado en este estudio incluye tanto especies introducidas como *Acacia sp (aromo)*, *Rosaceae Prunus* o *Rubus (durazno o mora, respectivamente)*, *Trifolium repens* (trébol), y *nativas*, compuestas por *Aristotelia chilensis* (maqui), *Trevoa quinquenervia* (tralhuén), *Retanilla trinervia* (tevo) y *Peumus boldus* (boldo). Si bien, no se detectó la presencia del género *Populus*, generalmente *Apis mellífera* utiliza esta planta para la elaboración de propolis, esto se pudo deber a que en las muestras seleccionadas para el análisis melisopalinológico no se encontraron pólenes pertenecientes a esta especie. Por lo cual, podemos decir que presumiblemente existió una baja proporción del género *Populus* (álamo).

Algunas plantas que se encontraron en importante proporción de acuerdo al análisis de morfología polínica de la muestra de propolis, esto es tralhuén, boldo y tevo (especies nativas), presentan según su metabolismo una fenología de desarrollo temprano, es decir, apenas terminan las lluvias de la estación de invierno comienzan su metabolismo vegetativo, liberando exudados. Ya que el propolis estudiado se recolectó en el mes de septiembre, en un lugar geográfico determinado se puede explicar, por esta razón, que los tipos botánicos antes mencionados tuvieran una mayor disponibilidad para *Apis mellifera* en la obtención de resinas y en la fabricación de este propolis.

Considerando estudios que sostienen que las propiedades medicinales del propolis varían de acuerdo a su origen botánico⁽¹³⁷⁾, las propiedades biológicas de esta muestra, en particular su capacidad biocida, serían diferentes de las publicadas en otros trabajos científicos, hecho que fue confirmado en esta investigación.

II.- Determinación de la CIM del propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*.

Este trabajo de investigación permitió comprobar *in vitro* que el propolis Apiherbal® chileno de la V región, tiene actividad antimicrobiana, sobre

Porphyromonas gingivalis. Mediante el método de dilución en agar, usado en este estudio, se determinó una CIM de 83,2mg/ml para este biocida.

Al mismo tiempo, al investigar el efecto del alcohol, solvente del propolis, sobre el crecimiento de *P.gingivalis*, se observó que concentraciones entre 0.2% y 35% de alcohol no inhibían el desarrollo bacteriano, mientras que concentraciones superiores, entre el 40% y 65%, inhibieron completamente dicho desarrollo.

El análisis de regresión lineal, entre las concentraciones de propolis probadas y el crecimiento bacteriano, determinó una recta con una pendiente pronunciada desde una concentración de 10,4mg/ml hasta 83,2mg/ml. El valor obtenido para el coeficiente de regresión, $r^2=0,92$, indicó que la variable concentración de propolis, es la única que estaría influenciando el crecimiento de *P. gingivalis*.

Lo anterior se corrobora con el hecho de que en el rango de concentraciones de propolis, en el que hubo inhibición de crecimiento, 10,4mg/ml a 83,2mg/ml, las concentraciones correspondientes de alcohol estuvieron en el rango de 0,23% a de 13,75%, en el cual se comprobó que este solvente no tenía influencia sobre el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

El valor de la CIM que inhibió el crecimiento del 75% de los aislados de *Porphyromonas gingivalis* en este estudio fue de 83,2mg/ml, el cual es mayor al

obtenido en otros estudios. Por ejemplo, Santos et al⁽⁹⁵⁾, evaluaron la susceptibilidad de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* frente al propolis, obteniendo valores de CIM entre 64µg/ml y 256µg/ml. Gebara et al⁽¹⁴⁾, analizaron un grupo de bacterias aerobias y anaerobias, entre ellas *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, obteniendo valores de CIM de 0,25µg/ml.

Estas diferencias podrían ser explicadas por distintas razones. Entre ellas, la composición de los medios de cultivo usados en los diferentes estudios, ya que se ha visto que los biocidas son influenciados por los componentes de los medios en que se realizan los ensayos de susceptibilidad⁽¹³⁸⁾. Por ejemplo, estudios de sensibilidad a flavomicina (antibiótico utilizado en alimentos para animales) de *Enterococcus* spp en agar Mueller-Hinton, mostró variaciones en la CIM explicadas por las diferentes concentraciones de proteínas y sangre utilizadas^(138,139). Considerando la gran cantidad de proteínas que posee el medio Mueller-Hinton y el suplemento de sangre y hemina-menadiona que se realizó en nuestro trabajo, es probable que estos componentes pudiesen haber interactuado con algún componente del propolis, disminuyendo la actividad antimicrobiana de éste.

Por otra parte, *Porphyromonas gingivalis* frente a variaciones microambientales, como aumento de temperatura, variación en suplemento de

nutrientes y presencia de sangre, regula la expresión genética variando la expresión de fimbrias, LPS y de proteinasas⁽¹⁰⁾. El crecimiento de *P.gingivalis* en un medio rico en hemina, según Lamont & Jenkinson⁽¹⁰⁾, aumenta su virulencia y la expresión de proteinasas, incrementando por ejemplo, la producción de tripsina. El medio que se utilizó en este estudio contenía hemina-menadiona pura, más sangre de cordero. Así, por la presencia de eritrocitos que constituían un aporte extra de hemina, este medio podría haber permitido el aumento de la secreción de proteinasas, las que podrían haber alterado algún componente de propolis y de esta forma disminuir su efecto antibacteriano.

Mas aún, es probable que *P. gingivalis*, frente a condiciones microambientales óptimas, se haga más resistente a determinados factores, en este caso la presencia de propolis, de acuerdo a estudios de Lamont & Jenkinson⁽¹⁰⁾, que dan cuenta de cambios fenotípicos dramáticos que ocurren en las bacterias debido a diferentes condiciones microambientales.

Según el origen botánico mixto determinado para propolis en este estudio, este contendría derivados de ácidos diperténicos, ácidos grasos hidroxilados o cinamil cinamato, componentes que poseerían una menor actividad antimicrobiana que la del propolis derivado del género *Populus* (presumiblemente en baja cantidad en nuestro

propolis), el cual contiene fenoles, flavonas y flavonoides en importante proporción (principalmente pinocembrina y galangina) otorgándole una mayor actividad antimicrobiana^(81,85). La baja proporción del género *Populus* en la elaboración del propolis por *Apis mellifera*, de acuerdo al análisis vegetal realizado en el presente estudio, podría explicar que la concentración inhibitoria mínima (CIM) sea más alta, en comparación con otros estudios similares^(14,95). Podríamos inferir que la concentración de estos dos compuestos, pinocembrina y galangina, sería baja en el propóleo usado, la cual solamente se corroborará con exactitud al realizar un análisis químico de él.

Al mismo tiempo, al comparar estos resultados con aquéllos obtenidos en ensayos con otros tipos bacterianos, tales como bacterias Gram positivo, también se encontraron diferencias en cuanto a las CIM obtenidas. Guzmán⁽⁴⁰⁾, obtuvo una CIM de 800µg/ml frente a *Streptococcus mutans*, lo cual se puede explicar por ser ésta una especie de bacterias cocáceas, facultativas, Gram positivo, las cuales, según algunos autores^(91, 93, 96), son más susceptibles al propolis que bacterias Gram negativo, como el caso de *P.gingivalis*. Es probable que tanto la estructura como la fisiología distintas de estas especies sean responsables de las diferencias observadas.

Además, los tipos de propóleos usados en los diferentes estudios, provienen de zonas geográficas distintas, por lo cual el origen botánico, como ya se ha discutido, es diferente y esto puede influir en las propiedades biológicas, al variar la composición química del propolis⁽¹³⁷⁾.

CONCLUSIONES

1.- El origen botánico del propolis Apiherbal®, usado en este estudio es mixto, es decir, compuesto por especies introducidas, *Acacia sp* (aromo), *Rosaceae Prunus* o *Rubus* (durazno o mora, respectivamente), *Trifolium repens* (trébol), y nativas, *Aristotelia chilensis* (maqui), *Trevoa quinquenervia* (tralhuén), *Retanilla trinervia* (tevo) y *Peumus boldus* (boldo). La baja proporción (o ausencia) de *Populus*, hace presumir que propolis no contiene fenoles, flavonas y flavonoides en importante proporción (principalmente pinocembrina y galangina) y que si posee derivados de ácidos diperténicos, ácidos grasos hidroxilados o cinamil cinamato⁽⁹⁵⁾, lo cual explicaría que posea una menor actividad antimicrobiana, reflejada por la alta concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenida en este estudio (83,2mg/ml) en comparación con estudios similares utilizando propolis de origen botánico diferente⁽⁸⁵⁾. Para tener certeza sobre esto, se requiere un análisis químico de la muestra del propolis usado.

2.- No obstante lo anterior, el presente trabajo demostró que el propolis Apiherbal®, proveniente de la V región de Chile, tiene la propiedad de inhibir el crecimiento *in vitro* de la bacteria periodontopatógena *Porphyromonas gingivalis*. Siendo esta

bacteria una especie anaeróbica estricta, Gram negativo, sus propias características fisiológicas podrían determinar la mayor cantidad de propolis requerida para inhibir su crecimiento.

3.- Dado que se trabajó con sólo una de las especies de periodontopatógenos más relevante, podría ser interesante, como lo demuestra este estudio, estandarizar las condiciones del ensayo para aplicarlo a otros periodontopatógenos, que en general requieren sistemas de cultivo exigentes, o incluso, a la microbiota total cultivada.

SUGERENCIAS

- 1.- Realizar ensayos comparando propolis de diferentes zonas geográficas de Chile, y por lo tanto, diferente origen botánico, para clasificarlos según su grado de actividad antimicrobiana, sería una manera de abordar el estudio de este producto natural de una forma mas clara y ordenada, considerando que Chile posee una gran diversidad de flora autóctona y clima privilegiado tal como ocurre y como se ha hecho en Brasil.
- 2.- Ya que en el presente estudio se determinó un origen botánico mixto, en el que participa una diversidad de flora tanto introducida como nativa, y de acuerdo a los estudios publicados, las propiedades biológicas dependen de la composición botánica⁽¹³⁷⁾, y por lo tanto química, sería interesante estudiar otras propiedades medicinales del propolis Apiherbal®, de origen chileno.
- 3.- El propolis, podría ser una alternativa antimicrobiana en el futuro, siempre y cuando se realicen estudios clínicos en pacientes con diferentes tipos de periodontitis, tanto crónicas como agresivas, con y sin asociación de tratamiento periodontal mecánico, evaluando parámetros clínicos como microbiológicos. En los parámetros clínicos se debería considerar no solamente los signos periodontales como profundidad de sondaje, nivel de inserción y sangramiento, sino que también,

comparar el tiempo que se demoran estos signos clínicos en remitir, ya que propolis posee un gran efecto antiinflamatorio y cicatrizante en heridas de tejidos blandos.

4- Estandarizar los sistemas de medios de cultivos para el estudio de propolis, ya que la composición de los caldos de cultivo puede tener algún grado de influencia en la actividad biológica del propóleos.

5.- Analizar la composición química del propolis, para estudiar y comparar según la literatura actual los componentes que estarían actuando en las propiedades biocidas de éste.

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad con alta prevalencia a nivel mundial, que produce gran destrucción de tejidos blandos y duros del diente, y pérdida de piezas dentarias. Se ha asociado con patologías sistémicas como diabetes, enfermedades cardiovasculares, parto prematuro y bajo peso en niños recién nacidos. Es una enfermedad infecciosa polimicrobiana, uno de cuyos agentes etiológicos más importantes es *Porphyromonas gingivalis*, especie de bacterias anaeróbicas estrictas, Gram negativo. Por otra parte, el uso de antibióticos sistémicos está indicado sólo en ciertos tipos de periodontitis, y no siempre el tratamiento es exitoso. Hoy en día, tanto en medicina general como odontológica, se está investigando nuevas alternativas de tratamientos antimicrobianos, dado el continuo aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales y por las reacciones adversas que estos producen en algunos pacientes. Propolis es un producto natural fabricado por la abeja *Apis mellifera* con variadas propiedades medicinales, entre ellas la antimicrobiana. Dichas propiedades dependen del origen botánico que utilizó *Apis mellifera* para su fabricación. En el presente estudio se investigó la actividad biocida *in vitro* del propolis chileno Apiherbal®, frente a 35 aislados de *P.gingivalis*

provenientes de pacientes chilenos con periodontitis, mediante la técnica de dilución en agar. Se obtuvo un valor de CIM de 83,2mg/ml, como necesario para inhibir el desarrollo del 75% de los aislados probados. El análisis del origen botánico del propolis permitió determinar un origen mixto, dentro del cual no se detectó la presencia del género *Populus*. Se sugiere que la CIM más alta determinada para este propolis, en comparación con otros, se puede deber a su composición química, a las características morfológicas y fisiológicas de *P.gingivalis*, y a diferencias en las metodologías utilizadas en la determinación de la concentración inhibitoria mínima.

REFERENCIAS

- 1.- Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G. (1986). The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* **13**: 570-577
- 2.- Socransky S, Haffajee A. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* **5**: 7-25
- 3.- Page RC, Schroeder HE. (1981). Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J Periodontol* **52**: 477-491
- 4.- Moore WEC, Moore LVH. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**: 66-77
- 5.- Haffajee AD, Socransky SS. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**: 78-111
- 6.- Dahlén G, Manji F, Baelum V, Ferjerskov O. (1989). Black-pigmented *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. *J Clin Periodontol* **16**: 305-310
- 7.- Socransky S, Haffajee A. (2002). Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* **28**: 12-55

- 8.- Zadeh HH, Nichols FC & Miyasaki KT. (1999). The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromona gingivalis* in periodontitis. *Periodontol 2000* **20**: 239-288
- 9.- Boone DR, and Castenholz RW. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed., vol. 1. Springer Verlag, New York, NY
- 10.- Lamont R, & Jenkinson H. (1999). Life below the gum line: Pathogenic Mechanism of *Porphyromona gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**(4):1244-1263.
- 11.- Committee on Research, Science and Therapy. (1996). Systemic antibiotics in Periodontics. *J. Periodontol* **67**: 831-838
- 12.- Sulakvelidze A., Zemphira A., and J. Glenn Morris Jr. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(3): 649-659
- 13.- Murphy M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**(4): 564-582
- 14.- Gebara E, Lima L, Mayer M. (2002). Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz J Microbiol* **33**(4): 365-369
- 15.- Fajuri M, Huerta J, Silva N. (2004). Eficacia del propóleo chileno como antimicrobiano contra microorganismos de interés en Odontología. Trabajo de

Investigación para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología,
Universidad de Chile

16.- Koo H. (2000). Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hidroxyapatite.

Caries Res **34**(5): 361-442

17.- Flemming T. (1999). Periodontitis. *Ann Periodontol* **4**(1): 32-37

18.- Loe H, Theilade E, Jensen SB. (1965). Experimental gingivitis in man.

J Periodontol **35**: 177-187

19.- Goodson JM. (1984). Acute exacerbation in chronic periodontal disease. *J Can*

Dent Assoc **50**(5): 380-387

20.- Gamonal J. (1996). Prevalencia de las enfermedades periodontales y de caries dental en la población de 35-44 y de 65-74 años de nivel socioeconómico bajo y medio-bajo de la provincia de Santiago, RM y determinación de los recursos humanos necesarios para su tratamiento. Tesis de grado para Magister en Periodoncia.

Universidad de Chile

21.- Beck J, Offenbacher S. (1998). Periodontitis: A risk factor coronary heart disease?.

Ann of Periodontol **3**: 127-141

- 22.- Genco RJ, Evans RT, Ellison SA. (1969). Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease. *J Am Dent Assoc* **78**(5): 1016-1036
- 23.- Ellison SA. (1970). Oral bacteria and periodontal disease. *J Dent Res* **49**(2):198-202
- 24.- Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, Van Houte J. (1977). Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res* **12**(2):90-106
- 25.- Consensus report. (1996). Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* **1**(1): 926-32
- 26.- Page RC, Kornman KS. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* **4**: 9-11
- 27.- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. (1999) Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000* **20**:136-67
- 28.- Offenbacher S. (1996). Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Ann Periodontol* **1**: 821-878
- 29.- Page RC. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* **26**(3 Pt 2): 230-242

- 30.- Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. (1994). Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the Oral Cavity: Cellular Origin and Relationship to Periodontal Status). *J Dent Res* **73**(8): 1397-1406
- 31.- Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH (2004). Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *J Clin Periodontol* **31**(9): 697-707
- 32.- Wilderer PA, and WG Charaklis. (1989). Structure and function of biofilms, p. 5-17. In W. G. Charaklis and P. A. Wilderer (ed.), Structure and function of biofilms. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- 33.- Lang NP, Mombelli A, y Attstrom M. (1997). Dental plaque and calculus. *Textbook of Clinical Periodontology and Implant Dentistry* 189–222. In: Lindhe J., Karring
- 34.- Socransky S, Haffajee A. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**: 134-144
- 35.- Jorgensen M, Aalam A, Slots J. (2005). Periodontal antimicrobials-finding the right solutions. *International Dental Journal* **55**: 3-12
- 36.- Ishikawa I, Baheni P, (2004). Nonsurgical periodontal therapy - where do we stand now? *Periodontol 2000* **36**: 9-13

- 37.- Walker CB. (1996). The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal flora. *Periodontol 2000* **10**: 78-88
- 38.- Slots J, Chen C. (1999). The oral microflora and human periodontal disease. In: G.W. Tannock, ed. Medical Importance of the Normal Microflora. London: Kluwer Academic Publishers. Pp 101-127
- 39.- Gajardo M, Silva, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, Gamonal J. (2005). Prevalence of Periodontopathic Bacteria in Aggressive Periodontitis Patients in a Chilean Population. *J Periodontol* **76**(2): 289-294
- 40.- Guzmán D. (2005). Actividad antimicrobiana se propóleos frente a *Streptococcus mutans*: estudio *in vitro*. Trabajo de investigación para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile
- 41.- Holt S, Kesavalu L, Walker S. & Genco C. (1999). Virulence factors of *Porphyromona gingivalis*. *Periodontol 2000* **20**:168-238
- 42.- Genco RJ, Zambon JJ, and Christersson LA. (1998). The origin of periodontal infection. *Adv Dent Res* **2**(2): 245-259
- 43.- Dasanayake A. (1998). Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk factor for low birth weight. *Ann of Periodontol* **3**: 51-61

- 44.- Olsen I, Shhah HN & Gharbia SE. (1999). Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromona gingivalis*. *Periodontol 2000* **20**: 14-52
- 45.- Shah HN, Hardie JM. (1979). Taxonomic studies on *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides oralis*, *Bacteroides ruminicola* and related organisms. *Res Clin Forums* **1**: 51-53
- 46.- Coykendall AL, Kacmarek FS, Slots J (1980). Genetic heterogeneity in *Bacteroides*. *Int J Sys Bacteriol* **30**: 559-564
- 47.- Okuda K, Takazoe I (1988). The Role of *Bacteroides Gingivalis* in Periodontal Disease. *Adv Dent Res* **2**(2): 260-268
- 48.- Bollen C, Quirynen M (1996). Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J Periodontol* **67**: 1143-1158
- 49.- Collins J, Offenbacher S (1993). Effects of a combination therapy to eliminate *Porphyromona gingivalis* in refractory periodontitis. *J Periodontol* **64**: 998-1007
- 50.- Blandizzi C, Malizia T (1999). Periodontal tissue deposition of Azithromycin in patients affected by chronic inflamatory periodontal diseases. *J Periodontol* **70**: 960-966

- 51.- Mombelli A, Samaranayake L (2004). Topical and systemic antibiotics in the managements of periodontal diseases. *Int Dental Journal* **54**: 3-14
- 52.- Position Paper. (1996). Systemic Antibiotics in Periodontics. *J Periodontol* **67**: 831-838
- 53.- Slots J (1996). Systemic antibiotics in periodontics. American Academy of Periodontology, position paper. *J Periodontol* **67**: 831-838
- 54.- Serino G, Rosling B, Ramberg P, Hellstrom MK, Socransky SS & Lindhe J (2001). The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. *J Clin Periodontol* **28**: 411-418
- 55.- Chow A, Bedsoy D (1977). Susceptibility of obligate anaerobes to metronidazol: an extended study of 1.054 clinical isolates. In: Finegold, SM (ed.). Metronidazole. Proceedings of the International Metronidazole Conference, Montreal, Quebec Canada, May 26-28, 1976. Excerpta Medica, Princeton p. 286-293
- 56.- Lacroix JM, Mayrand D (1989). The effect of subminimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents on three bacterial mixtures. *Oral Microbiol Immunol* **4**(2): 82-8
- 57.- Position Paper. (2004). Systemic Antibiotics in Periodontics. *J Periodontol* **75**: 1553-1565

- 58.- Gill CJ, Pallasch TJ. (1981). Clindamycin-associated pseudomembranous colitis: a potentially fatal adverse reaction. *J Am Dent Assoc* **102**(4): 507-9
- 59.- Gordon J, Walker C, Lamster I, West T, Socransky S, Seiger M, M & Fasciano R. (1985). Efficacy of clindamycin hydrochloride in refractory periodontitis: 12-month results. *J Periodontol* **56**(suppl): 75-80
- 60.- Slots J, Rams TE (1990). Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* **17**: 479-493
- 61.- Labro MT (2000). Interference of Antibacterial Agents with Phagocyte Functions: Immunomodulation or "Immuno-Fairy Tales"? *Clinical Microbiology Reviews* **13**(4): 615-650
- 62.- Rams TE, Babalola O, Slots J. (1990). Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy? *Oral Microbiol Immunol* **5**(3): 166-8
- 63.- Walker CB, Karpinia K & Baheni P. (2004). Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontol 2000* **35**: 146-165
- 64.- Drisko CL., Cobb CM, Killoy WI, Michalowicz B, Phhlstrom BL, Lowenguth RA, Caton IG, Encarnación M, Knowles M, Goodson IM (1995). Evaluation of

periodontal treatments using controlled release tetracycline fibers: clinical response. *J*

Periodontol **66**: 692-699

65.- Newman MG, Kortnman KS, Doherty FM (1994). A 6 months multicenter evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planing in maintenance patients: clinical results. *J Periodontol* **65**: 685-691

66.- Rodríguez C. (2000). Eficacia antimicrobiana de soluciones irrigadoras de canales radiculares. Dissertación presentada al Programa de Maestrado en Medicina Tropical de Universidad Federal de Goiás. pp 27

67.- Treating Livestock with Medical Plant: Beneficial or Toxic?.

<http://www.guiaverde.com/arboles/caripapaya.htm>

68.- Bavestrello P. Introducción a la Fitoterapia. Universidad Católica de Chile.

69.- Ghisalberti EL. (1979). Propolis a Review. *Bee Word* **60**: 59-84

70.- Chaillou LL (2004). Estudio del Propóleos de Santiago del Estero. Argentina. *Cienc Tecnol Aliment Campinas* **24**(1): 011-015

71.- Burdock L. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chemical Toxicol* **36**: 347-363

72.- Marcucci MC (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**: 83-89

- 73.- Ricciardelli d'Albore. (1979). L'origine géographique de la propolis. *Apidologie* **10**: 241-267
- 74.- Montenegro G, Timmermann BN, Peña RC, Mujica A & Avila G (2000). Pollen grains and vegetative structures in propolis as indicators of potential reactions in Chilean plants. *Phyton (International Journal of Experimental Botany)* **66**: 15-23
- 75.- Brushi ML, Franco SL, Gremiao MP (2003). Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **26**(14): 2399-2409
- 76.- Havsteen B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**(2-3) 67-202
- 77.- König B. (1985). Plant sources of propolis. *Bee world* **66**(136): 136-139
- 78.- Greenaway W, English S, Wollenweber E, Whatley FR (1989). Series of novel flavanones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudates of *Populus fremontii* and *Populus maximowiczii*. *J Chromatogr* **481**: 352-357
- 79.- Kumazawa S, Katsumi H, Katsuko K, Ishii T, Hamasaka T, Nakayama T, (2002). Studies of the constituents of Uruguayan Propolis. *J Agric Food Chem* **50**: 477-4782
- 80.- Lu Y, Wu C, Yuan Z (2004). Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary chromatography.

Fitoterapia **75**(3-4): 267-76

81.- Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition.

Phytomedicine **12**(3) 221-228

82.- Marcucci MC, Bankova V. (1999) Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Top Phytochem* **2**: 115-123

83.- Bohlman F, Kramp W, Grenz M, Robinson H, King R (1981). Diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* **20**: 1907-1913

84- Alarcón R, Nuñez J. (1989). Estudios Químico de propóleos. Tesis de Grado de Pedagogía en Biología, Facultad de Química y Ciencias Naturales, Universidad Austral de Chile

85.- Muñoz O, Peña R, Ureta E, Montenegro G, Caldwell C, Timmermann B. (2001). Phenolic Compounds of Propolis from Central Chilean Matorral. *Z Naturforsch* **56**(3-4): 273-7

86.- Valcic S, Montenegro G, Mujica AM, Avila G, Franzblau S, Singh MP, Maiese WM & Timmermeann BN. (1999). Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from central Chile. *Z Naturforsch* **54**: 406-416

- 87.- Muñoz O, Peña RC, Ureta E, Montenegro G & Timmermann BN (2001). Propolis from Chilean matorral hives. *Z. Natursforsch* **56**(3-4): 269-72
- 88.- Montenegro G, Pizarro R, Avila G, Mujica AM, Peña R, Ginocchio R. (2000). Botanical resources for propolis in an apiary network in Central Chile. *Phyton (International Journal of Experimental Botany)* **69**: 191-201
- 89.- Montenegro G, Peña RC, Avila G & Timmermann BN. (2001). Botanical origin and seasonal production of propolis in hives of Central Chile. *Bolm Bot Univ Sao Paulo* **19**: 1-6
- 90.- Gebara E, Zardetto C, Mayer M. (1996). *In Vitro* study of the antimicrobial activity of natural substances against *S. mutans* and *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ Sao Paulo* **10**: 251-256
- 91.- Quintana J, Rodríguez O, Díaz M, López M. (1997). Empleo de la tintura de propóleos al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. *Rev Cubana Estomatol* **34**(1): 25-27
- 92.- Park YK. (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol* **36**: 24-28
93. Drago L, Mombelli B, Vecchi E, Fascina M, Tocalli M, Gismondo M. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J Chemotherapy* **12**: 390-395

- 94.- Velikova M, Bakova V, Sorkun K, Popova S, Kujungiev A. (2001) Chemical composition and biological activity of propolis from Turkish and Bulgarian origin. *Mellifera* **1**(1): 57-59
- 95.- Santos F, Bastos E, Rodriguez P, Uzeda M, Carvalho M, Farias L, Moreira E, (2002). Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromona gingivalis*) to Propolis (Bee Glue) and other Antimicrobial Agents. *Anaerobe* **8**(1): 9-15
- 96.- Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic-Vlahovic S. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* **158**: 353-357
- 97.- Sawaya A, Palma A, Caetano F, Marcucci M, Da Silva I, Araujo C, Shimizu M. (2002). Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of candida. *Letters in applied Microbiology* **35**: 203-207
- 98.- Amoros M, Lurton E, Boustic J, Sauvager F, Cormier M. (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-enyl caffeate. *J Nat Prod* **57**: 644-647

- 99.- De Campo R, Paulino N, Da Silva C, Scremin A, Calixto J. (1998). Anti-hyperalgesic Effect of an Ethanolic Extract of Propolis in Mice and Rats. *J Pharm Pharmacol* **50**: 1187-1193
- 100.- Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS. (1993). Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp Clin Res* **19**(5): 197-203
- 101.- Ivanovska N, Dimov V, Bankova V, Popov S. (1995). Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo. *J Ethnopharmacol* **47**: 145-147
- 102.- Kiderman A, Torten R, Furst A, Reinus K. (2001). Bi-lateral eosinophilic ulcers in an infant treated with propolis. *Journal of Dermatological Treatment* **12**: 29-31
- 103.- Heo MY, Sohin J & Au W. (2001). Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat Res* **488**: 135-150
- 104.- Matsushige K, Basnet P, Hase K, Kadota S, Tanaka K, Namba T. (1996). Propolis protects pancreatic beta-cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomedicine* **3**: 203-209
- 105.- Rosalen PL, Koo H, Cury JA, Park YK. (1998). Efeito da propólis em rato de ssalivado dessalivado. *15ª Reunião Anual da SBPqO Res.*, A-074, 30

- 106.- Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. (1991). Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* **25**: 347-351
- 107.- Gispert E, Cantillo E, Rivero A, Padrón M. (2000). Actividad anticaries de una crema dental con propóleos. *Rev Cubana Estomatol* **37**(3): 166-170
- 108.- Walker P & Crane (1987). Constituents of propolis. *Apidologie* **18**(4): 327-334
- 109.- Greenaway W, Scaysbrook T & Fr Whatley (1991). Identification by gas chromatography-mass spectroscopy of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung* **46c**: 111-121
- 110.- García Viguera C, Ferreres F & Tomás-Barberán F. (1993) Study of Canadian propolis by GC/MS and HPLC. *Zeitschrift fur Naturforschung* **48c**: 731-735
- 111.- Bankova V, Christov R, Popov S, Pureb O & Bocari G. (1994). Volatile constituents of propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung* **49c**: 6-10
- 112.- Kujumgiev A, Tsevetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R & Popov S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* **64**: 235-240
- 113.- Ureta E, Montenegro G, Muñoz O, Lemus I. (2001). Compuestos bioactivos en propóleos del mediterráneo chileno. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

- 114.- Bankova V, Popov SS & Mareko NL. (1983). A study on flavonoids of propolis. *J Nat Prod* **46**: 471-474
- 115.- Doodstar H, Burke MD & Mayer RT. (2000). Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochromes P450 CYP1 and CYPB1. *Toxicology* **144**: 31-38
- 116.- Yannai S, Day AJ, Williamson G & Rhodes MJC. (1998). Characterization of flavonoids as monofunctional or bifunctional inducers quinona reductasa in murine hepatoma cell lines. *Food Chem Toxicol* **36**: 623-630
- 117.- Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. (2000). *In Vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol* **31**: 174-77
- 118.- Bonhevi JS, Coll F, Jorda R. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J Am Oil Chem Soc* **71**: 529-532
- 119.- Takaisikikuni N, Schilcher H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med* **60**: 222-227
- 120.- Jin UH, Chung TW, Kang SK, Suh SJ, Kim JK, Chung KH, Gu YH, Suzuki I, Kim CH. (2005). Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clin Chim Acta* **362**(1-2): 57-64

- 121.- Hwang HJ, Park HJ, Chung HJ, Min HY, Park EJ, Hong JY, Lee S.K. (2005). Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Nutr Biochem* Oct. 5
- 122.- Tae-Wook C, Sung-Kwon M, Young-Chae C, Jeong-Heon K, Young-Choon L, Gun C, Soo-Hyun K, Jong-Guk K. (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal* **18**: 1670-1681
- 123.- Liao H, Chen Y, Liu J, Hsu M, Shieh H, Liao HJ, Shieh C, Shiao M, Chen Y. (2003). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *J Agric Food Chemistry* **51**(27): 7907-12
- 124.- Al-Shaner A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Bagh D, (2004). Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *Journal of Endodontics* **30**(5): 359-361
- 125.- Martin MP, Pileggi R. (2004). A quantitative analysis of propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dental traumatology* **20**: 85-89

- 126.- Koo H. (2002). Effect of a moutrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res* **36**(6): 445-449
- 127.- Fernandez SG, Aleman E, Figueroa B, Fagoaga E, Rivera J, Purroy A. (2004). Direct and airborne contact dermatitis from propolis in beekeepers. *Contact Dermatitis* **50**: 320-321
- 128.- Hay KD, Greig DE. (1990). Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **70**(5): 584-6
- 129.- Gulbahar O, Ozturk G, Erdem N, Kazandi A, Kokuludag A. (2005). Psoriasiform contact dermatitis due to propolis in a beekeeper. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* **94**(4): 509-511
- 130.- Slots J. (1986). Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* **1**(1): 48-57
- 131.- Montenegro G, Gómez M, Ávila G. (1992) Importancia relativa de especies cuyo polen es utilizado por *Apis mellifera* en el área de la Reserva Nacional Los Ruiles, VII Región de Chile. *Acta Botánica Malacitana* **17**:167-174
- 132.- Heusser J. (1971). Pollen and spores from Chile. University of Arizona Press, Tucson, AZ
- 133.- Erdtman G. (1952). Libro, Palynology and Plant Taxonomy

- 134.- Hodges Dorothy. (1986). The pollen loads of the Honey bee. Segunda edición. G. Beard & Son Ltd. Brighton, UK
- 135.- Slots J, Reynold H. (1982). Long-wave UV light fluorescence for identification of black-pigmented bacteroides spp. *Journal of Clinical Microbiology* **16**(6): 1148-1151
136. - Norman G, Streiner D. Bioestadística. Madrid, Mosby/Doyma. 1996. 260 p.p 100-107, Capítulo 12; p 150-152, Capítulo 16
137. - Farré R, Frassetto I, Sánchez A. (2004). El propolis y la salud. *Ars Pharm* **45**(1): 21-43
138. - Butaye P, Devriese L, Haesebrouck F. (1998). Effects of different test conditions on MICs of food animal growth-promoting antibacterial agents for *Enterococci*. *J Clinical Microbiol* **36**(7): 1907-1911
- 139.- Butaye P, Devriese L, Haesebrouck F. (2000). Influence of different medium components on the *in vitro* activity of the grow-promoting antibiotic flavomycin against *Enterococci*. *J Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 713-716
- 140.- XVII Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra. Alicia Rossi”. Buenos Aires, Argentina, 2003

ANEXO

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

Consentimiento informado Tesis Microbiología

Yo _____

RUT _____ domicilio _____

_____ teléfono _____ autorizo para la

realización de procedimientos de toma de muestra de sacos
periodontales para ser sometidos a análisis microbiológico.

Enfermedades Sistémicas:

Medicamentos:

Diagnóstico Periodontal:

Piezas muestras:

Firma

