



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

“Actividad antimicrobiana de propóleo frente a streptococcus mutans : estudio in vitro”

Daniela Andrea Guzmán Morales

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Marta Gajardo Ramírez.**

**TUTORES ASOCIADOS
Dra. María Teresa Ulloa Flores
Dr. Moisés Arriagada Rojas**

**Santiago – Chile
2005**

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la caries dental sigue siendo una enfermedad de alta prevalencia en casi todos los países del mundo^(1,2). Esta patología compromete la calidad de vida de las personas, ya que causa la destrucción y, eventualmente, la pérdida de las piezas dentarias, afectando el aparato masticatorio⁽¹⁾. *Streptococcus mutans*, en primer lugar, seguido por *Streptococcus sobrinus*, son los principales agentes etiológicos de la caries dental en humanos. Estas especies bacterianas pertenecen al grupo de microorganismos definido como mutans streptococci^(3,4).

La prevención de la caries dental consiste, primordialmente, en impedir la transmisión del agente patógeno, reducir los niveles del agente patógeno de la cavidad oral, incrementar la resistencia de los dientes al ataque ácido (producto del metabolismo de las bacterias patógenas) y restringir la ingestión de carbohidratos en la dieta (sustrato necesario para el metabolismo de las bacterias patógenas)⁽⁴⁾.

El propóleo es una sustancia natural no tóxica producida por las abejas *Apis mellifera* que tiene propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, inmunoestimulantes, cicatrizantes, analgésicas, anestésicas, citostáticas, y antifúngicas^(5,6). Sin embargo, la eficacia de estas propiedades depende sustancialmente de la zona geográfica en la que el propóleo se produce, ya que ésta determina su composición química^(5,6).

En varias investigaciones se ha comprobado que el propóleo inhibe la actividad de las glucosiltransferasas, enzimas que sintetizan polímeros extracelulares involucrados en la adherencia y acumulación bacteriana, y el crecimiento de mutans streptococci, entre los que se incluye *Streptococcus mutans*⁽⁶⁻¹⁰⁾.

El efecto de un antimicrobiano sobre el crecimiento de un microorganismo dado se puede evaluar mediante varios parámetros. Uno de ellos es la determinación de la Concentración

Inhibitoria Mínima (CIM), que permite evaluar cuantitativamente el efecto antimicrobiano de una sustancia sobre un microorganismo. Sobre la base de lo anteriormente planteado, el principal objetivo de este trabajo fue investigar *in vitro* la CIM del propóleo frente al crecimiento de *Streptococcus mutans*, con el fin de obtener información que podría ser de gran utilidad para evaluar su potencial uso como un agente terapéutico preventivo de la caries dental en humanos.

II. MARCO TEÓRICO

1. CARIES DENTAL

1.1 Importancia en Salud Pública.

La caries dental aún representa un problema de salud pública en muchas partes del mundo⁽²⁾. Constituye la enfermedad infecciosa más prevalente que afecta a humanos, y es la principal causa de pérdida de piezas dentarias tanto en niños como en adultos⁽⁴⁾.

La prevalencia es un concepto epidemiológico que permite cuantificar las enfermedades en grupos humanos, que se define como el número total de casos en un momento determinado, en un lugar determinado. La prevalencia de caries se puede estimar a través del índice COPD, que representa el número de dientes con caries (C), obturados (O), perdidos o con indicación de extracción (P) que existe en la cavidad bucal de un individuo, considerando a cada diente como una unidad (D)⁽¹⁾.

La prevalencia de la caries dental es diferente entre los países desarrollados y subdesarrollados, observándose una relación directa entre el desarrollo económico de ellos y la prevalencia de caries. En los últimos años se han observado notables variaciones en la prevalencia de la caries dental en los países desarrollados como EEUU y países Escandinavos, particularmente en escolares. Se ha observado un descenso de alrededor de un 30% de la prevalencia de caries en este grupo etáreo, alterándose el perfil epidemiológico desde un COPD alto a uno bajo a moderado. Por ejemplo, en EEUU el 50% de la población infantil de 12 años está libre de esta enfermedad^(1,2). En cambio, otra realidad se vive en los países en desarrollo, observándose un aumento o estancamiento de los indicadores de caries dental. Se realizaron estudios en 1996, 1997 y 1999 en la población chilena de 12 años, mediante los cuales se calculó el promedio de la prevalencia de esta enfermedad según índice de COPD, obteniéndose un valor de 3,42⁽¹¹⁾.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido unas normas de prevalencia de caries dental para la edad de 12 años, determinando los siguientes niveles:

COPD	Nivel de Prevalencia
0,0-1,1	muy bajo
1,2-2,6	bajo
2,7-4,4	moderado
4,5-6,4	alto
>6,6	muy alto

De acuerdo a las normas establecidas por la OMS para clasificar la prevalencia de caries dental en la población de 12 años, Chile se considera como país de moderada prevalencia⁽¹⁾. Estudios de los años 1996, 1997, y 1999 demuestran que existe un alto porcentaje de niños chilenos con caries: en niños entre los 6 y los 8 años de edad se encontró que un 84,67% presentaban caries, mientras que en niños de 12 años se encontró que el 84,34% padecía esta enfermedad⁽¹¹⁾.

Históricamente, el significado de la caries dental para la salud humana se ha minimizado porque no representa una amenaza para la vida. Sin embargo, su tratamiento representa un alto costo en el presupuesto de los países. En E.E.U.U. el costo anual para el tratamiento sintomático de la caries dental y de la enfermedad periodontal en 1977 superaba los 11 billones de dólares; en 1984, era aproximadamente de 24 billones de dólares. Más del 90% de estos gastos eran destinados a la restauración de piezas dentarias o tejidos dentarios

perdidos a causa de la caries dental. Sin embargo, estas cifras de dinero sólo cubrían alrededor del 40 al 50% las necesidades del público que regularmente visitaba al odontólogo y recibía tratamiento. De acuerdo a estos datos, la caries dental y, en menor medida, la enfermedad periodontal, se podrían considerar como las enfermedades infecciosas más caras que los individuos deben sobrellevar durante toda una vida⁽¹⁻³⁾.

1.2 Etiología de la caries

Según la OMS “Caries dentaria es aquella lesión patológica que reblandece los tejidos duros del diente y que llega a formar una cavidad en estos tejidos”⁽¹²⁾.

Huerta J. (1975) sugiere una definición más amplia que la de la OMS: “Caries dentaria es aquella enfermedad infecciosa bacteriana transmisible, determinada por múltiples factores, caracterizada por una destrucción progresiva e irreversible del tejido duro dentario, comenzando con una pequeña lesión del esmalte o cemento dentarios y que posteriormente avanza a la profundidad, llegando a comprometer la pulpa dentaria”⁽¹²⁾.

Las bacterias que causan esta enfermedad infecciosa disponen de enzimas necesarias para metabolizar los azúcares de la dieta y formar ácidos capaces de disolver el esmalte⁽¹⁾. Por lo tanto, la pérdida de sustancia dentaria representa una etapa tardía de proceso patológico que ha progresado durante meses o años⁽²⁾.

En el hombre, el agente etiológico más importante de la caries dental es *Streptococcus mutans*⁽³⁾.

A fines del siglo pasado se comenzó a investigar con más acuciosidad la etiología y patogénesis de la caries dental. W.D. Miller postuló que la caries era el resultado de la producción conjunta de ácidos por parte de los microorganismos presentes en la cavidad bucal, que provocaban la descalcificación de la superficie dental. Además, postuló que dichos microorganismos producían ácidos a partir de los carbohidratos de la dieta humana. Esta sustentación científica derivó en la teoría quimioparasitaria de la caries. De esta manera, se asumió que toda bacteria bucal era odontopatógena, originándose la “Hipótesis de Placa Inespecífica”⁽¹³⁾.

Sobre la base de esta teoría se creó el modelo quirúrgico de tratamiento dental, que considera los siguientes puntos:

1. No se requiere diagnóstico ya que todos los dientes tienen placa bacteriana y como toda bacteria en la placa tendría características odontopatógenas era lógico pensar que todos los individuos presentaban la enfermedad.
2. Toda la población debe ser tratada ya que en todos los individuos se forma placa bacteriana.
3. Se debe realizar una remoción continua de placa bacteriana ya que esta se forma constantemente. Esto se consigue mediante instrucciones al paciente, el cual se debe cepillar frecuentemente.
4. Si falla el tratamiento es responsabilidad del paciente, ya que la aparición de caries en éste se debe a una falta de control de la placa bacteriana dental.

En este modelo quirúrgico de tratamiento de la caries dental basado en la “Hipótesis de Placa Inespecífica” los dentistas cumplen un rol eminentemente técnico y artesanal, ya que sólo reparan el daño causado por el proceso patológico^(1,3,14). Sin embargo, dicha hipótesis fue consecuencia de ciertas observaciones erróneas relacionadas con la falta de desarrollo tecnológico de esa época. Por ejemplo, Miller no pudo conocer que en la cavidad oral se desarrollan distintos ecosistemas microbianos. Las bacterias que colonizan los surcos y fisuras son distintas a las que pueden colonizar la lengua o el surco gingival. Así, en la década de los sesenta esta teoría comenzó a ser cuestionada cuando Keyes P.H. (1960) demostró que la caries era una enfermedad infecciosa y transmisible. Dicha transmisibilidad puede ocurrir por intercambios de saliva que contiene *Streptococcus mutans* entre los miembros de una familia. Keyes estableció en forma teórica y experimental que en la etiopatogenia de la caries dental interactúan simultáneamente 3 factores principales: el factor “microbiano” (placa bacteriana dental), que bajo la presencia adecuada de un factor “sustrato” (dieta) logra afectar un factor “diente” (hospedero) (Tríada de Keyes)⁽¹⁵⁾. Actualmente, se ha agregado el factor “tiempo” a estos 3 factores primarios, estableciéndose la Tríada Modificada de Keyes⁽¹⁴⁾. Entonces, para el desarrollo de la caries, estos factores deben interactuar en condiciones óptimas: un hospedero con tejidos susceptibles (dientes), colonizado por una microbiota con potencial cariogénico, consumiendo con frecuencia (tiempo) una dieta rica en sacarosa^(1,14). Además de estos 3 factores fundamentales, existen otros parámetros que influyen en el proceso de formación de caries como el flujo salival, la exposición a fluoruros, higiene oral, educación y motivación odontológica, entre otros⁽¹⁴⁾.

A partir de los postulados de Keyes, se inició una nueva era de investigación sobre la placa bacteriana dental, lo que llevó a postular a Loesche W.J. (1976) la “Hipótesis de Placa Específica”, que actualmente es la más aceptada. Esta hipótesis propone que sólo un limitado

número de bacterias en la placa bacteriana dental causan caries o enfermedad periodontal, y que los restantes microorganismos presentes en la placa bacteriana dental están en equilibrio con el hospedero⁽³⁾.

Sobre la base de esta nueva hipótesis surgió el modelo médico del tratamiento de la caries como enfermedad infecciosa, el cual postula que:

1. El diagnóstico es esencial.
2. Sólo pacientes en riesgo de manifestar la infección clínica son tratados, es decir, pacientes que presentan abundante placa bacteriana, con una alta frecuencia de consumo de sacarosa, con alteraciones sistémicas o que estén tomando fármacos que alteran la salivación.
3. El tratamiento está enfocado a disminuir o eliminar los microorganismos odontopatógenos.
4. Si falla el tratamiento es responsabilidad del tratante debido a un diagnóstico erróneo.

Por lo tanto, este modelo médico de tratamiento postula que primero se debe eliminar o disminuir los niveles de bacterias que causan la caries y luego restaurar los tejidos dañados⁽¹⁴⁾.

A) Placa bacteriana dental

Desde el nacimiento del individuo, la cavidad bucal se encuentra expuesta a numerosos microorganismos presentes en el medio ambiente local. Estos microorganismos colonizan los tejidos blandos (mucosa oral) y posteriormente al erupcionar, los tejidos duros (dientes)

de la cavidad bucal por medio de mecanismos específicos de adherencia, favorecidos por las condiciones nutricionales y fisiológicas allí presentes. Las diversas regiones anatómicas de la cavidad bucal determinan diferentes condiciones para el desarrollo de los microorganismos. Algunas superficies protegen a los microorganismos de la fricción y fluidos corporales; otras presentan diferencias en la tensión de oxígeno y nutrientes. De manera que la cavidad oral posee diversos ambientes determinando una variabilidad en el crecimiento, desarrollo y localización de especies bacterianas como sucede en lengua, crévice y superficies dentarias⁽¹⁾.

Se puede definir la placa bacteriana dental como “la comunidad diversa de microorganismos, que se encuentra en la superficie dental como un biofilm, empotrada en una matriz extracelular de polímeros provenientes tanto del hospedero como de microorganismos”⁽¹⁶⁾.

A su vez, un biofilm es “una comunidad de bacterias sésiles adheridas a una superficie, cuya formación ocurre en respuesta a una variedad de señales del medio ambiente”⁽¹⁷⁾.

Los principales componentes de la placa bacteriana son bacterias, película salival adquirida, y matriz interbacteriana, cada uno de los cuales analizaremos a continuación⁽¹⁸⁾.

A.1) Bacterias:

Se ha comprobado que especies seleccionadas de la microbiota bucal total compone la biota de la placa bacteriana dental en una primera etapa, específicamente especies del género *Streptococcus*. Se ha observado que los primeros colonizadores corresponden, principalmente, a tres especies bacterianas: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguis*⁽¹⁹⁾.

En la placa bacteriana dental madura las bacterias son el principal componente (70 % de su volumen)^(12,18). Aunque la composición microbiana varía en los diferentes individuos dependiendo de la edad de la placa y de la región dentaria que se analice, investigaciones

revelan una composición relativamente común⁽¹⁾. En la placa bacteriana supragingival destaca, en general, una gran cantidad de cocos Gram positivos (40-50%), especialmente del tipo *Streptococcus spp*, sobre todo en los primeros días de formación de la placa bacteriana. En menor proporción se encuentran bacilos Gram positivos (10-40%), y bacilos Gram negativos (10-15%). Especies de *Actinomyces*, bacilos cortos Gram positivos dispuestos en forma ramificada (letra china), representan un 4% o menos de las bacterias de la placa bacteriana supragingival^(1,18).

En un estudio realizado por Mandel I.D., Levy B. y Wasserman B. en 1957 se corroboró que la proporción de bacterias cocáceas decrece y la de *Actinomyces* aumenta a medida que la placa bacteriana madura⁽¹⁸⁾.

En las placas de superficie lisa y de surcos y fisuras existe un predominio de especies acidógenas. En la región dentaria cervical existe una alta proporción de especies de *Actinomyces* con actividad proteolítica⁽¹⁾.

Se pueden reconocer diferentes etapas en el proceso de formación de la placa bacteriana dental:

- a) *Formación de la película adquirida del esmalte humana.* Esta película se forma mediante la adsorción de moléculas a la superficie dental, provenientes tanto del hospedero como de los microorganismos⁽¹⁶⁾. La película adquirida del esmalte está formada por proteínas, péptidos y otras moléculas orgánicas. Constituye una interfase protectora entre la superficie dental y el medio ambiente bucal, ya que actúa como una barrera selectivamente permeable que regula los procesos de mineralización/remineralización. Además, determina la composición microbiana del biofilm que se forma sobre la superficie dental. En un reciente estudio *in vivo*

realizado en ratones se verificó la presencia de diferentes proteínas como albumina, amilasa, statherin y proteínas ricas en prolina, entre otras⁽²⁰⁾.

- b) *Transporte pasivo de bacterias bucales a la superficie dental.* Interacciones fisicoquímicas permiten la unión reversible entre la superficie celular bacteriana y la superficie dental, cubierta por la película adquirida. Se constató, en un estudio *in vivo*, que se forma una menor cantidad de placa bacteriana en superficies con poca energía-libre de superficie e hidrofóbicas. Esto se explica de acuerdo a los principios termodinámicos que postulan que cepas bacterianas con una elevada energía-libre de superficie (característica que posee la mayoría de las bacterias bucales) se debieran adherir, preferentemente a un sustrato hidrofílico, y que cepas bacterianas con una baja energía-libre de superficie se debieran adherir mayoritariamente a un sustrato hidrofóbico. Sin embargo, se observó *in vitro* que la adsorción de una película salival modificaba las propiedades fisicoquímicas de la superficie del sustrato. Debido a las discrepancias encontradas en los estudios *in vitro* e *in vivo* se ha postulado que los microorganismos se adhieren durante los períodos en que existen pocas fuerzas que impidan la unión de las bacterias a la superficie dental, como por ejemplo, bajo flujo salival⁽²⁰⁾.

Una vez establecida la unión reversible, ocurre la interacción entre moléculas específicas de superficie bacteriana (adhesinas) y receptores complementarios presentes en la película adquirida del esmalte, que permite la adhesión irreversible de las bacterias a la superficie dental^(16,19). Por ejemplo, las proteínas salivales statherin y proline-rich-protein1 han sido implicadas como receptores para fimbria1 en *Actinomyces viscosus*⁽¹⁹⁾.

- c) *Co-adhesión de colonizadores tardíos a colonizadores iniciales previamente adheridos.* Esta etapa también involucra interacciones interbacterianas entre adhesinas y receptores (generalmente involucrando lectinas), aunque también se ha visto que ocurren algunas interacciones electrostáticas y ácido-base entre los microorganismos^(16,19). De esta manera, aumenta la diversidad microbiana del biofilm y ocurren interacciones metabólicas ventajosas entre los microorganismos, como ocurre durante la co-adhesión de bacterias aeróbicas y especies anaeróbicas estrictas, que permite la supervivencia de estas últimas en ambientes oxigenados^(16,21).
- d) *Multiplificación de los microorganismos adheridos.* La división celular permite el crecimiento confluyente, y la organización tridimensional y funcional del biofilm. Adicionalmente, se sintetizan polímeros extracelulares que forman una matriz extracelular compleja, que puede retener nutrientes, agua y enzimas claves para los microorganismos⁽¹⁶⁾.
- e) *Desprendimiento activo.* Las bacterias pueden responder a señales ambientales y desprenderse de las superficies, pudiendo adherirse, posteriormente, a otros sitios. Por ejemplo, enzimas producidas por bacterias sésiles pueden hidrolizar adhesinas específicas que unen células a la superficie⁽¹⁶⁾. Además, se ha postulado que la película adquirida formada sobre sustratos hidrofóbicos puede tener una fuerza cohesiva menor si se compara cuando ésta se forma en sustratos hidrofílicos. La menor fuerza cohesiva de la película adquirida puede determinar un mayor número de desprendimiento bacteriano en condiciones adversas como durante la ingesta de alimentos o al hablar⁽²¹⁾. Por último, las bacterias pueden liberar biosurfactantes que pueden estimular su propio desprendimiento cuando las condiciones ambientales son

desfavorables y, también, pueden impedir la adherencia de otras especies bacterianas competitivas⁽²¹⁾.

Recientemente, se ha comprobado que las diferentes etapas de formación de la placa bacteriana están reguladas por la expresión regulada y coordinada de genes específicos bacterianos, que a su vez responden a determinados estímulos ambientales. Los sistemas conocidos como “two-component regulatory systems”, generalmente están involucrados en el control de la expresión genética y la consecuente adaptación de los microorganismos al ambiente. Además, “quorum-sensing signaling” es una vía que se activa en respuesta a una densidad celular determinada y que constituye un mecanismo de comunicación célula-célula intraespecie, que también regula la expresión genética en bacterias, permitiendo su adaptación y supervivencia en ambientes hostiles^(16,22).

Varios investigadores han sugerido que la unión inicial reversible de *Streptococcus mutans* a la película adquirida del esmalte es mediada por componentes de superficie. Después, se produciría una unión más fuerte de dichas bacterias a la película adquirida mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares (glucanos) por enzimas conocidas como glucosiltransferasas a partir de la sacarosa^(1,4). Sin embargo, en una investigación reciente se comprobó que *Streptococcus mutans* se adhiere a glucanos sintetizados *in situ* en películas salivales experimentales, lo que sugiere que los glucanos podrían estar involucrados en la adherencia inicial de este microorganismo. Además, existen bacterias que forman parte de la placa bacteriana inmadura que también sintetizan glucanos, como *Streptococcus sanguis*, lo que también podría favorecer la unión inicial de *Streptococcus mutans* a la superficie dental. Se debe destacar que solamente mutans streptococci se unen específicamente a los glucanos⁽²²⁾.

Streptococcus mutans sintetiza glucanos solubles en agua (con enlaces α -1,6) e insolubles en agua (con un predominio de enlaces α -1,3), mediante varias glucosiltransferasas. Algunos de los glucanos sintetizados permanecen unidos a la enzima, que a su vez puede encontrarse en solución o adsorbida a la superficie dental. Los glucanos también se pueden unir a una proteína de superficie celular conocida como “glucan-binding-protein”⁽⁴⁾. Además, los glucanos forman parte de la matriz extracelular de la placa bacteriana, favoreciendo su volumen y porosidad, y disminuyendo su contenido inorgánico⁽²⁴⁾.

En un estudio realizado en un modelo de ratones, a los que se implantó cepas mutantes de *Streptococcus mutans* defectivas en genes involucrados en la síntesis de glucanos tanto solubles como insolubles, se comprobó una disminución en la formación de caries en superficies lisas, sobretodo en los mutantes que tenían alteraciones en los genes involucrados en la síntesis de glucanos insolubles⁽²⁵⁾.

A.2) Patogenicidad de la placa bacteriana

En general, las bacterias que componen la placa bacteriana y las que constituyen la microbiota normal de la cavidad bucal no son patógenas. Se mantienen en un estado de comensalismo con el hospedero a menos que ciertas circunstancias externas o ajenas a los microorganismos, tales como falta de higiene, dieta alimenticia inadecuada, malos hábitos masticatorios, entre otros, favorezcan el desarrollo exagerado de algunas especies bacterianas, rompiéndose el equilibrio en que permanecen normalmente ⁽¹²⁾.

La placa bacteriana supragingival puede producir caries debido a que, a través de su actividad metabólica, sintetiza sustancias capaces de desmineralizar el esmalte dental⁽¹⁾. La lesión

cariosa es el resultado de la desmineralización del esmalte durante la exposición al ácido producido por las bacterias de la placa bacteriana. El punto crítico para la desmineralización del esmalte se encuentra alrededor de pH 5.5 a 5.6. Stephan R.M. (1944) observó que el pH de la placa bacteriana descendía a niveles muy por debajo del pH crítico de la desmineralización del esmalte, pocos minutos después de la aplicación de carbohidratos. Luego de un período de tiempo, el pH volvía a su nivel original. Este fenómeno es como conocido como curva de Stephan⁽²⁶⁾.

La placa bacteriana expuesta a carbohidratos produce ácido láctico, acético, propiónico, fórmico y butírico. De estos, el ácido láctico es el que más influye en la caída del pH, ya que el ritmo de formación de éste corresponde a la disminución inicial del pH que se observa en la curva de Stephan. *Streptococcus mutans* es el principal productor de ácido láctico⁽¹⁾.

Existen zonas específicas del diente que favorecen la acumulación de placa bacteriana. Éstas son las fosas, fisuras y zonas interproximales bajo el punto de contacto, que estadísticamente corresponden a la áreas de mayor incidencia de caries⁽¹⁾.

La particular agregación de los microorganismo de la placa bacteriana restringe y dificulta la difusión de elementos neutralizantes y favorece el ingreso de moléculas neutras como la sacarosa. Se comporta como un gel floculante selectivo. De esta manera, potencia el efecto de los ácidos al retrasar su movimiento hacia el exterior. El fosfato y el calcio difunden fácilmente a través de la placa bacteriana, lo que favorece el proceso de desmineralización⁽¹⁾.

La gran concentración de bacterias potencial y realmente lesivas presentes en la placa bacteriana (250 billones de bacterias en 1 gramo de placa), junto a las características selectivas de difusión y de producción de metabolitos tóxicos, le confieren a la placa bacteriana la capacidad patógena sobre los tejidos duros del diente⁽¹⁾.

B) Dieta

La dieta constituye un aspecto trascendental dentro de la patogenia de la caries, ya que los alimentos son la fuente de nutrientes necesaria para el metabolismo de los microorganismos⁽¹⁾. Una dieta cariogénica corresponde a una dieta de consistencia blanda, con alto contenido de hidratos de carbono refinados que se depositan con facilidad en las superficies dentarias retentivas (fosas, fisuras, puntos de contacto y zona crevicular). La sacarosa refinada es el azúcar más comúnmente ingerido en la dieta de los humanos⁽¹⁴⁾.

La placa bacteriana expuesta a carbohidratos produce ácido láctico, acético, propiónico, fórmico y butírico. De éstos, el ácido láctico es el que más influye en la caída del pH de la placa bacteriana dental al punto crítico (entre pH 5,5 y 5,6), en el que se produce la desmineralización del diente. *Streptococcus mutans* es el principal productor de ácido láctico en la placa bacteriana⁽¹⁾.

Un descenso sostenido del pH de la placa bacteriana dental es necesario para mantener un grado de desmineralización permanente del esmalte. Esta situación puede lograrse con exposiciones cortas y repetidas de azúcares sobre la placa o bien con alimentos que sean difíciles de retirar de la superficie dentaria⁽¹⁾.

C) Hospedero

Existen dientes y superficies dentarias que son más susceptibles a la formación de caries. Se ha observado que la prevalencia de la caries es mayor en las superficies oclusales de los primeros y segundos molares, y es menor en las caras linguales de los incisivos inferiores^(1,3). Por otra parte, la permeabilidad del esmalte disminuye con la edad, a través de un proceso de maduración estructural que se verifica con posterioridad a la erupción dentaria. Este proceso consiste fundamentalmente en la capacidad del esmalte de incorporar moléculas pequeñas que influirán en sus propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, con la edad se produce un aumento progresivo del contenido de fluoruro en el esmalte dental, lo que lo hace más resistente a la disolución ácida provocada por la placa bacteriana. Por lo tanto, los cambios que se producen en la estructura del esmalte dental pueden influir en el proceso de formación de la caries dental⁽¹⁾.

La prevalencia de caries también está ligada a otros factores como alineación de los dientes en la arcada, anatomía de la superficie dentaria, textura superficial y otros factores de naturaleza hereditaria⁽¹⁾.

Por otro lado, existen personas libres de caries, a pesar de consumir sustratos cariogénicos y a pesar de poseer elevadas cantidades de *Streptococcus mutans* en la composición de la placa bacteriana^(1,4). De esta manera se habla de sujetos no susceptibles a la caries, inmunes a la caries o libres de caries⁽¹⁾.

2. STREPTOCOCCUS MUTANS:

En 1924, Clarke J.K. fue el primer investigador que realizó una asociación entre la etiología de la caries dental y un tipo especial de estreptococos, al aislar dichos microorganismos de lesiones cariosas de humanos. Los denominó *Streptococcus mutans* porque al realizar la tinción Gram se observaban especies cocáceas con forma más ovalada que redonda, por lo que parecían ser una forma mutante de estreptococos^(3,4). Las evidencias de Clarke fueron olvidadas por varios años porque otros investigadores no pudieron aislar *Streptococcus mutans* de lesiones cariosas. En 1960 Fitzgerald R.J. y Keyes P.H. demostraron que los miembros de una colonia de hamsters sin caries, sin embargo poseedores de una microbiota autóctona compuesta por innumerables microorganismos acidogénicos, sólo desarrollaban caries cuando eran contaminados con ciertos estreptococos específicos, provenientes de lesiones de hamsters caries activos y sometidos a una dieta rica en sacarosa⁽²⁷⁾. En este experimento se comprobó que la caries resultaba de una infección transmisible que involucraba una especie bacteriana determinada, más tarde identificada como *Streptococcus cricetus*, perteneciente al grupo mutans streptococci⁽³⁾.

Posteriormente, dada la heterogeneidad serológica, genética y biotípica que se detectó en la especie previamente definida como *Streptococcus mutans*, se redefinió como grupo mutans streptococci, al cual nos hemos referido anteriormente. Sobre la base de antígenos de carbohidratos presentes en la pared celular bacteriana, se pudo reconocer 8 serotipos dentro de este grupo, y estudios de hibridización de ácido desoxirribonucleico (DNA) revelaron la existencia de 4 grupos genéticos diferentes. Estos grupos genéticos fueron elevados al “status” de especie y se les denominó de acuerdo a la fuente de aislamiento (mamífero). Así, *Streptococcus mutans* fue el nombre que se asignó a los aislados humanos de mutans streptococci, y contiene cepas que poseen los antígenos c, e y f. El serotipo c de esta especie representa el 70% de los aislados encontrados en el hombre de mutans streptococci. La

mayoría de las cepas restantes, poseían los antígenos d, g, h, que definían la especie denominada *Streptococcus sobrinus*. *Streptococcus rattus* (serotipo b) proviene de aislados de ratas de laboratorio y *Streptococcus cricetus* (serotipo a) proviene de aislados de hamsters de laboratorio. Estos dos últimos se han detectado, ocasionalmente, en placa dental humana. El *Streptococcus ferus* aislado de ratas salvajes es serotipo c, pero su origen genético no está relacionado con *Streptococcus mutans*. También se ha aislado un estreptococo serotipo c de placa dental de monos, pero con características diferentes a *Streptococcus mutans* humano, por lo que a esta especie se le asignó el nombre de *Streptococcus macacae*⁽³⁾. Algunas características propias de cada especie se presentan en la Tabla 1⁽³⁾.

Tabla 1: Características diferenciales de especies de mutans streptococci.

Mutans Streptococci	Cariogénico		Serotipo (s)	Carbohidratos de la pared celular	Contenido G+C (mol%)
	Animales	Humanos			
<i>S. mutans</i>	+	+	<i>c, e, f</i>	Glucosa, ramnosa	36-38
<i>S. sobrinus</i>	+	¿?	<i>d, g, h</i>	Glucosa, galactosa, ramnosa	44-46
<i>S. cricetus</i>	+	-	<i>a</i>	Glucosa, galactosa, ramnosa	42-44
<i>S. rattus</i>	+	-	<i>b</i>	Glucosa, ramnosa	41-43
<i>S. ferus</i>	-	-	<i>c</i>	¿?	43-45
<i>S. macacae</i>	¿?	-	<i>c</i>	Glucosa, ramnosa	35-36

G+C: contenido guanina-plus-citosina de DNA.

Las bacterias pertenecientes al grupo mutans streptococci se caracterizan por ser cocáceas Gram (+), dispuestas en cadenas, capaces de fermentar sorbitol y manitol, producir glucanos

a partir de sacarosa y, excepto *Streptococcus ferus*, son cariogénicos en modelos animales de experimentación⁽³⁾.

Actualmente, sobre la base de numerosos estudios en este tema, hay consenso en considerar a *Streptococcus mutans* como el agente etiológico principal de la caries dental en humanos^(3,4). Este microorganismo se considera el iniciador de las lesiones de caries, pero una vez instalada la lesión, se asocia a bacterias del género *Lactobacillus* y a la especie *Actinomyces viscosus*⁽¹⁴⁾.

Streptococcus mutans tiene varias características que le permiten predominar en la placa bacteriana e inducir el desarrollo de caries dental. Es acidogénico (genera ácidos), acidófilico (se desarrolla en medio ácido) y acidúrico (sigue elaborando ácido a pH bajo). Metaboliza la sacarosa más rápidamente que cualquier otro microorganismo, almacena polisacáridos intracelularmente, los cuales utiliza como reserva de energía, y sintetiza complejos fructanos y glucanos, que promueven su adherencia a la pieza dentaria^(4,12,14).

3. PROPÓLEO O PRÓPOLIS

El propóleo es una sustancia natural no tóxica producida por las abejas *Apis mellifera*^(9,24), que se ha utilizado ampliamente por muchos años en la medicina tradicional⁽²⁸⁾. Los egipcios, por ejemplo, lo usaban para embalsamar cadáveres de sus dignatarios 5000 años atrás. Se ha utilizado en Europa y norte de África para la curación de heridas y el tratamiento de las infecciones de boca y garganta, así como de la caries. En el África sub-sahariana se utiliza todavía con fines medicinales y en otras variadas aplicaciones⁽²⁸⁾.

Las abejas recogen con sus mandíbulas partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de Indias, pino,

abeto, roble y algunas herbáceos) que, una vez en la colmena, mezclan con cera y secreciones salivares para obtener el propóleo⁽²⁸⁾.

La palabra própolis deriva del griego: *pro-*(para o en defensa), y *polis-* (la ciudad), es decir defensa de la ciudad o colmena en este caso. En efecto, esta sustancia es utilizada en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena⁽²⁸⁾.

3.1 Composición

La composición del propóleo es sumamente compleja y variada en función de la diversidad fitogeográfica de las zonas de recolección. Se han aislado más de 180 compuestos, siendo los principales componentes⁽²⁸⁾:

Resinas y bálsamos	45-55%
Cera	7,55-35%
Aceites volátiles	5-10%
Ácidos grasos	5%
Polen	5%
Otros compuestos orgánicos y minerales	5%

Entre las resinas y los bálsamos del propóleo se han detectado principalmente flavonoides, ácidos fenólicos o sus ésteres⁽²⁸⁾, aunque los métodos de análisis de que se disponen actualmente permiten detectar un número cada vez mayor en el mismo, comprobándose la variabilidad en su composición. Los principales compuestos activos son los flavonoides^(9,28).

3.2 Propiedades farmacológicas

Al propóleo se le atribuyen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, inmunoestimulantes, cicatrizantes, analgésicas, anestésicas, citostáticas, y antifúngicas. Sin embargo, se debe considerar que las propiedades del propóleo dependen sustancialmente de la zona geográfica en la que se produce, ya que ésta determina su composición química^(5,6).

Además, puede tener efectos sinérgicos con antibióticos, puesto que aumenta el efecto de estos últimos cuando son administrados en conjunto. Stepanovic S. et al (2003) comprobaron la actividad sinérgica *in vitro* de 13 diferentes extractos etanólicos de propóleo provenientes de diferentes regiones de Serbia con distintos antibióticos como ampicilina y un antifúngico (nistatina) mediante el método de difusión en agar⁽²⁹⁾.

También se debe tener en cuenta que el propóleo es una causa reconocida de dermatitis ocupacional en apicultores. Se han descrito varios casos de reacción de hipersensibilidad retardada a propóleos y también, Callejo A. et al (2001) publicaron un caso de reacción de hipersensibilidad inmediata a esta sustancia. Se han descrito varios alérgenos comunes entre el propóleo y el bálsamo de Perú, una secreción del árbol *Myroxylon balsamum L.*, responsables de la reactividad cruzada entre ambos⁽³⁰⁾. Masticar grandes cantidades de

propóleo en bruto puede producir náuseas y trastornos digestivos, y a los apicultores les produce dolor de cabeza inspeccionar las colmenas⁽²⁸⁾.

3.3 Antecedentes relacionados con Odontología

En Odontología se ha empleado preparados con propóleo en tratamientos de gingivitis, aftas bucales, estomatitis aftosas, cirugía bucal, alveolitis, recubrimiento pulpar, periodontitis, bolsas periodontales, entre otros⁽³¹⁾. Se ha comprobado que soluciones de propóleo incrementan significativamente el valor del test de dureza de Vickers en el esmalte dental, por lo que se le atribuyen propiedades remineralizantes⁽²⁸⁾.

La actividad antibacteriana del propóleo sobre especies de la microbiota oral también ha sido estudiada. Park Y.K. et al (1998) investigaron la acción de extractos de propóleo de diferentes regiones de Brasil sobre diferentes bacterias bucales (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, otros estreptococos y *Actinomyces naeslundii*). Todas las muestras de propóleo inhibieron el crecimiento de todas estas especies bacterianas⁽⁸⁾. Además, en varias investigaciones se ha comprobado que el propóleo inhibe la actividad de las glucosiltransferasas y el crecimiento de especies bacterianas del grupo mutans streptococci, *in vitro*, entre las que se incluye *Streptococcus mutans*⁽⁶⁻¹⁰⁾.

En un estudio realizado por Ikeno K. et al (1991), se demostró que al incluir un extracto etanólico de propóleo proveniente de China en agua (concentración final de propóleo de 1mg/ml) se lograba una disminución de la incidencia de caries de 56,2% a 62,2% en ratones⁽⁷⁾. En otro estudio realizado por Koo H. et al (1999) se comprobó la eficacia de dos extractos etanólicos de propóleo provenientes del sur y sudeste de Brasil para reducir la incidencia de lesiones cariosas en ratones, aplicados en forma tópica dos veces al día⁽⁵⁾.

Por otro lado, se han realizado estudios clínicos para investigar el efecto del propóleo en la reducción de la placa bacteriana como también su actividad anticaries. Se realizó una investigación para evaluar el efecto de un colutorio con propóleo en placa dental de 3 días. El índice de placa se redujo significativamente (44,7% aproximadamente) después del tratamiento con propóleo comparado con el placebo. Además, el colutorio con propóleo redujo la concentración de polisacáridos insolubles en la placa en un 61,7% comparado con el placebo⁽²⁴⁾.

Gispert A.E. et al (1998) realizaron un estudio en escolares que utilizaron un gel dental de clorofila y una crema dental con propóleos rojos para evaluar su efecto sobre varios parámetros relacionados con la caries dental. Se obtuvieron resultados favorables en la disminución del grado de infección por *Streptococcus mutans* y la elevación de la capacidad individual de remineralización utilizando ambos productos⁽³²⁾. Además, realizaron otro estudio en el año 2000 en escolares con alta infección de *Streptococcus mutans* para probar la actividad anticaries de una crema dental con propóleo. Se obtuvo una reducción de un 85,6% de individuos afectados por caries en el grupo de pacientes que utilizó la crema dental con propóleo en comparación con el inicio del estudio, mientras que la reducción del índice de caries fue de 90,2% en este grupo en relación con el inicio. No hubo diferencias significativas en estos dos parámetros medidos en el grupo de pacientes que usaron una crema dental placebo⁽³¹⁾.

Por último, existen varios estudios que han investigado la actividad antibacteriana del propóleo sobre especies del grupo mutans streptococci, *in vitro*. En un estudio realizado por Koo H. et al (2000) se investigó la actividad antimicrobiana de propóleos provenientes del Noreste, Sudeste, y Sur de Brasil. Para el propóleo del noreste de Brasil se obtuvo una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 25 µg/ml para *Streptococcus sobrinus* y

Streptococcus cricetus; y de 50 µg/ml para *Streptococcus mutans*. Para el propóleo del sur de Brasil se obtuvo una CIM de 50 µg/ml para *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus cricetus*; y de 100 µg/ml para *Streptococcus mutans*. Para el propóleo del sureste de Brasil se obtuvo una CIM de 400 µg/ml para todas las especies del grupo mutans streptococci estudiadas. Los valores de Concentración Bactericida Mínima (CBM) fueron 4 a 8 veces mayores que los valores de CIM para los diferentes propóleos⁽³³⁾.

En el estudio *in vitro* efectuado por Duarte S. et al (2003), se determinó la CIM y la CBM de un propóleo brasileño, denominado tipo 6, sobre diferentes especies del grupo mutans streptococci, incluido *Streptococcus mutans*. Los valores de CIM que se obtuvieron fueron de 50 µg/ml para una cepa de *Streptococcus sobrinus*; y de 100 µg/ml para las cepas restantes de *Streptococcus sobrinus* y para todas las cepas de *Streptococcus mutans* estudiadas. Los valores de CBM obtenidos fueron de 800 µg/ml para todas las cepas de *Streptococcus sobrinus* estudiadas, 1600 µg/ml para una cepa de *Streptococcus mutans* y >1600 µg/ml para las restantes cepas de *Streptococcus mutans* estudiadas⁽¹⁰⁾.

Fajuri M.C. (2004) realizó un estudio *in vitro* mediante pruebas de difusión en agar para probar la susceptibilidad de *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans* frente a un tipo de propóleo chileno proveniente de la VIII región del país mediante el método de Difusión en Agar. En este estudio se encontró que todos estos microorganismos, excepto *Porphyromonas gingivalis*, eran susceptibles a este propóleo⁽³⁴⁾.

4. ANTECEDENTES SOBRE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La susceptibilidad *in vitro* de las bacterias a los agentes antimicrobianos se puede ensayar mediante varios métodos. Uno de ellos es el método de Dilución en Agar, que permite medir

cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente al crecimiento bacteriano, mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). El agente antimicrobiano se incorpora al medio de cultivo (agar) de manera tal que se prepara un set de placas con concentraciones de antimicrobiano diferente en cada una (dilución seriada). El National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS) recomienda la utilización del agar Mueller-Hinton suplementado con sangre desfibrinada de oveja al 5% (v/v) para la técnica de Dilución en Agar. Los inóculos estandarizados de los distintos aislados del microorganismo se pueden aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando un replicador. La mayoría de los replicadores existentes transfieren de 32 a 36 inóculos por placa. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) es la mínima concentración de un antimicrobiano que inhibe el desarrollo visible de un microorganismo⁽³⁵⁾.

Para evaluar la posibilidad de utilizar un tipo de propóleo chileno proveniente de la VIII región del país como un agente terapéutico contra la caries dental en humanos, el propósito de este trabajo de investigación fue determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de dicho antimicrobiano sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, mediante el método de Dilución en Agar.

III. HIPÓTESIS

“El propóleo inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans in vitro*, a una concentración entre 50 µg/ml y 100 µg/ml”.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Determinar *in vitro* la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de un propóleo chileno, proveniente de la VIII región, frente al crecimiento de *Streptococcus mutans*.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Aislar *Streptococcus mutans* a partir de muestras de saliva de dadores voluntarios chilenos.
- 2.- Identificar y caracterizar tanto morfológica como bioquímicamente aislados de *Streptococcus mutans*.
- 3.- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima de un propóleo chileno, proveniente de la VIII región, sobre cepas aisladas de *Streptococcus mutans* y sobre la cepa de referencia ATCC 35668, de *Streptococcus mutans*.
- 4.- Investigar la actividad antibacteriana del alcohol al 55%, utilizado como solvente del propóleo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio experimental se desarrolló en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile en conjunto con el laboratorio del Programa de Microbiología-Micología de la Facultad de Medicina de la misma universidad.

I.- Propóleo:

Se utilizó un extracto etanólico de propóleo al 30% de marca Proapis®, proveniente de la VIII región de Chile.

II.- Siembra, aislamiento e identificación de cepas chilenas de *Streptococcus mutans*.

Se obtuvieron cepas de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de saliva completa, de donantes voluntarios con dentición mixta y permanente de las comunas de Las Condes, Ñuñoa, Padre Hurtado, Lo Espejo y La Cisterna de Santiago de Chile, que presentaban variable historia de caries y estaban sanos periodontalmente.

Las muestras de saliva diluidas (10^{-4}) en PBS fueron sembradas en agar TYCSB, medio de cultivo selectivo para *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Un litro de TYCSB contiene Bacto-casitone (Difco) 15 g, yeast extract (BBL) 5 g, L-cystine 0,2 g, Na_2SO_3 0,1 g, NaCl 1 g, Na_2HPO_4 12 aq. 2 g, NaHCO_3 2 g, acetato de sodio 3 aq. 20 g, sacarosa 50 g y agar 15g. Después de suspender el polvo y autoclavar, se incorporó 0,1 unit/ml de bacitracina al medio estéril, una vez que éste se enfrió hasta alcanzar una temperatura de 45°C , y se dispensó aproximadamente 20 ml de medio por placa⁽³⁶⁾. Las placas sembradas con saliva diluida se incubaron por 48 horas a 36°C en anaerobiosis (Jarra Gas-Pack + generador de anaerobiosis). Posteriormente, las colonias bacterianas que presentaron características morfológicas compatibles con *Streptococcus mutans* fueron resembradas en agar TYCSB para su aislamiento y multiplicación. La caracterización microscópica de la especie se

realizó mediante Tinción Gram y para la identificación final se usó el test de Hidrólisis de Esculina. Para esta última prueba se utilizaron cultivos bacterianos de 24 a 48 horas, los cuales se sembraron en caldo Brain Heart Infusion (Difco) conteniendo 1% de Esculina (Difco), y posteriormente, se incubaron a 36°C por 24 a 48 horas en anaerobiosis. Después de este tiempo se agregaron 2 o 3 gotas de Citrato férrico amoniacal (Sigma) al 1%. Se consideró esculina positivos a los cultivos que dieron un color café-negrusco como resultado de la combinación de iones de hierro con el producto de la hidrólisis de la esculina que es la esculina⁽³⁷⁾. Cepas esculina positivas se identificaron como *Streptococcus mutans*⁽³⁸⁾ y sólo éstas fueron incluidas en este estudio.

III.- Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

La cepa de referencia ATCC 35668 de *Streptococcus mutans*, proporcionada por el laboratorio del Programa de Microbiología-Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, fue crecida y mantenida en agar Sangre y en agar TYCSB.

El agar Sangre se preparó utilizando Tryptic Soy Agar (Difco) según las indicaciones del fabricante. El medio se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar hasta una temperatura de 45° C. Alcanzada esta temperatura se agregó rápidamente, en forma estéril bajo campana de flujo laminar (Filtro/Met), sangre de oveja al 5% (v/v) final.

Tanto la cepa ATCC 35668 como las cepas chilenas de *Streptococcus mutans* se mantuvieron en criopreservación a -80°C en 300 µl de glicerol estéril hasta ser ensayados.

IV.- Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de un propóleo chileno frente a *Streptococcus mutans* mediante el método de Dilución en Agar.

Se estudió la susceptibilidad de 60 cepas de *Streptococcus mutans* chilenas y de la cepa de referencia de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 a un propóleo chileno, proveniente de la VIII región, mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), a través del método de Dilución en Agar⁽³⁵⁾.

En esta investigación se realizaron dos ensayos para la determinación de CIM:

1) ***En agar Mueller-Hinton suplementado con sangre***, en el cual se estudiaron 36 cepas de *Streptococcus mutans* provenientes de saliva humana. El agar Mueller-Hinton se preparó según las indicaciones del fabricante. El medio se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar en baño de agua hasta 45-50 ° C antes de agregar sangre de cordero al 5% (v/v) final. Todo esto se realizó en forma estéril bajo campana de flujo laminar (Filtro/Met).

Las concentraciones de propóleo probadas en este ensayo fueron 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml y 800 µg/ml. También se investigó la actividad antimicrobiana del alcohol al 55%.

2) ***En agar TYCS (sin bacitracina)***, en el cual se estudiaron 43 cepas de *Streptococcus mutans* provenientes de saliva humana y la cepa ATCC 35668.

Este ensayo se realizó con el fin de mejorar la recuperación de cepas con respecto al ensayo anterior, dado que el agar TYCS está especialmente desarrollado para el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Se probaron las concentraciones de propóleo de 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml y 1600 µg/ml. La actividad antimicrobiana del alcohol al 55% también fue investigada.

IV a) Preparación de placas de agar con diferentes concentraciones de propóleo para ensayos de CIM por el método de Dilución en Agar.

1) Preparación de las concentraciones de antimicrobiano:

Se preparó en alcohol al 55% una solución madre 10 veces más concentrada que la última concentración de propóleo a probar, la que se esterilizó mediante filtro Millipore de 0,22 μm . A partir de esta solución madre se obtuvieron las concentraciones de propóleo definidas para este estudio, según lo descrito en la literatura, de manera que al ser colocadas en el agar se obtuvieron las concentraciones finales deseadas.

2) Preparación de placas de agar Mueller-Hinton y de agar TYCS con propóleo:

Se prepararon los medios de cultivo agar Mueller-Hinton y agar TYCS según lo descrito anteriormente. Se dispensaron 18 ml de medio en tubos tapa rosca estériles 18 ml bajo campana de flujo laminar (Filtro/Met). Luego, se permitió enfriar los tubos con el medio de cultivo en baño de agua hasta 45-50°C. Alcanzada esta temperatura se agregó rápidamente, en forma estéril bajo campana de flujo laminar (Filtro/Met), 2 ml de la concentración de propóleo correspondiente. Esta mezcla se homogeneizó y se vació rápidamente cada tubo en una placa de petri. Se preparó el número necesario de placas para cada ensayo, las que se incubaron por 18 hrs a 36°C para comprobar su esterilidad⁽³⁵⁾.

IV b) Preparación del inóculo.

Para los ensayos de CIM, las cepas de *Streptococcus mutans* debían encontrarse en crecimiento exponencial, por lo cual se usaron cultivos de 24 a 48 horas en agar TYCSB o agar Sangre.

El inóculo de cada cepa de *Streptococcus mutans* se estandarizó para el método de Dilución en Agar. Para esto se preparó una suspensión de cada aislado bacteriano en suero fisiológico

a una turbidez de 0,5 de Mc Farland, medida en densitómetro (Biomerieux), la que equivale a una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml⁽³⁵⁾.

IV c) Inoculación e incubación de las placas de agar:

De cada tubo que contenía una suspensión del aislado bacteriano estandarizado se tomó con micropipeta una alícuota y se distribuyó en el correspondiente posillo de la policubeta del replicador de Steer, que permite transferir 36 inóculos por placa (Fotos 1, 2, 3 y 4). Se confeccionó una plantilla de cada placa de agar para conocer la ubicación de los inóculos. El replicador de Steer está calibrado para colocar una alícuota de 1-2 μ l de cada inóculo sobre la superficie del agar⁽³⁵⁾.



Fotos 1, 2, 3 y 4. Se observa el modo de uso del replicador de Steer. A un extremo se dispone la policubeta que contiene los 36 inóculos bacterianos, en la cual se introducen 36 clavos estériles dispuestos en una pequeña bandeja insertada en el brazo movable. Luego, se traslada la pequeña bandeja hacia el otro extremo del replicador, donde se dispone la placa de petri con el medio de cultivo, para depositar los inóculos bacterianos sobre la superficie del agar.

Además, se inoculó una placa control de agar sin antimicrobiano al inicio del ensayo de sensibilidad (control de viabilidad), luego se inocularon las placas que contenían las distintas concentraciones de propóleo, comenzando con la de menor concentración. Posteriormente se inoculó la placa que contenía alcohol al 55%. Al final, se inoculó una segunda placa control al finalizar la serie para confirmar que no hubo contaminación durante este proceso⁽³⁵⁾.

Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que se secan los inóculos. Luego se incubaron invertidas a 36°C en anaerobiosis por 48 horas.

IV d) Determinación de la CIM

Para la determinación de CIM las placas se colocaron sobre una superficie oscura y opaca. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se registró como el valor de la menor concentración de propóleo que inhibió completamente el desarrollo bacteriano, bajo estas condiciones. El desarrollo de una simple colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo se consideró sin crecimiento⁽³⁵⁾.

V.- Análisis estadístico de los resultados.

El efecto del propóleo y del alcohol al 55% sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* se comparó mediante el test de Chi-cuadrado. Además, la variación del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans*, de acuerdo a las diferentes concentraciones de propóleo probadas tanto en agar Mueller-Hinton como en agar TYCS, se analizó mediante análisis de regresión simple y correlación de Pearson⁽³⁹⁾.

VII. RESULTADOS

I.- Aislamiento e identificación de cepas de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de saliva humana.

En agar TYCSB se obtuvieron colonias aisladas con las características que se describen en la Tabla II. A cada cepa se le asignó un número y las iniciales correspondientes de cada donante.

Tabla II. Morfología, adherencia y resultados del Test de Esculina de cada aislado bacteriano obtenido a partir de muestra de saliva.

Cepas de <i>S.mutans</i>	Morfología colonial	Adherencia Colonial	Test Esculina
ATCC, GM-2, MA-5, PB-7, JE-8, S-9, S-12, S-13, S-14, S-15, S-16, S-17, B-18, B-19, CA-20, MG-21, LL-23, IA-26, OM-27, OM-28, XX-33, XX-35, J-37, CR-39	Pequeñas, cristalinas, superficie rugosa.	+++ ⁽¹⁾	+ ⁽²⁾
S-11, OM-29, OM-30, IU-31, V-32	Medianas, cristalinas, superficie rugosa.	+++ ⁽¹⁾	+ ⁽²⁾
CR-45, CR-46, S-59	Pequeñas, aspecto azucarado, superficie rugosa.	+++ ⁽¹⁾	+ ⁽²⁾
XX-36, C-42	Medianas, aspecto azucarado, superficie rugosa.	+++ ⁽¹⁾	+ ⁽²⁾
J-38, CC-54	Grandes, aspecto azucarado, superficie rugosa.	+++ ⁽¹⁾	+ ⁽²⁾
YI-40, AM-41, CR-43, CR-44, CR-47, DG-52, MA-57, MA-58	Pequeñas, cristalinas, superficie lisa.	+++ ⁽¹⁾	+ ⁽²⁾
GM-1, MA-6, S-10, LL-24, XX-34, CR-48, CR-49, MF-50, MC-51, GM-53, AM-60	Medianas, cristalinas, superficie lisa.	+++ ⁽¹⁾	+ ⁽²⁾
J-3, J-4, AM-22, MC-25, J-55, J-56	Grandes, cristalinas, superficie lisa.	+++ ⁽¹⁾	+ ⁽²⁾

(1) +++: muy adherente.

(2) +: resultado positivo

Las características morfológicas de las colonias de *Streptococcus mutans* obtenidas a partir de muestras de saliva humana se observan en las Fotos 5, 6, 7 y 8.

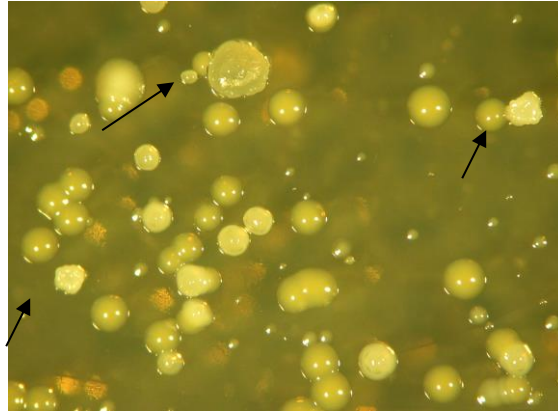


Foto 5. Colonias de *Streptococcus mutans* obtenidas en TYCSB a partir de muestras de saliva. Se indican con flechas colonias de *Streptococcus mutans* de aspecto transparente, superficie irregular y de bordes rugosos (foto obtenida con lupa estereoscópica Stemi 2000 C, Zeiss).



Foto 6. Colonia de *Streptococcus mutans* de aspecto cristalino y superficie rugosa. Alrededor de la colonia se ven algunas gotitas de líquido que corresponde al dextrán producido por *Streptococcus mutans* (foto obtenida con lupa estereoscópica Stemi 2000 C, Zeiss).

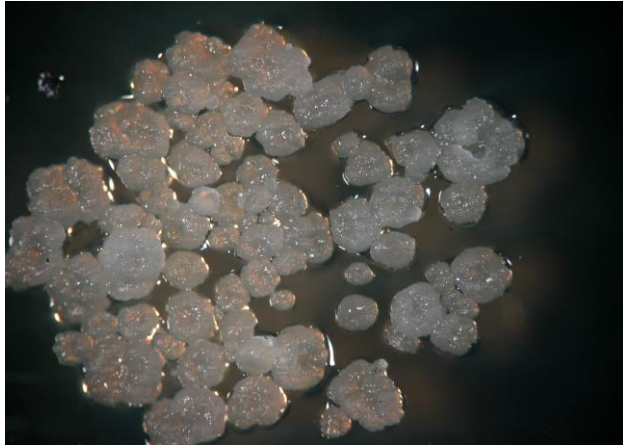


Foto 7. Colonias de *Streptococcus mutans* de aspecto azucarado y aspecto rugoso (foto obtenida con lupa estereoscópica Stemi 2000 C, Zeiss).

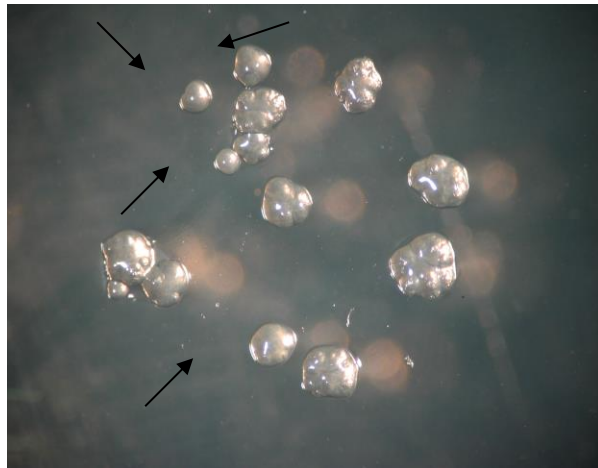
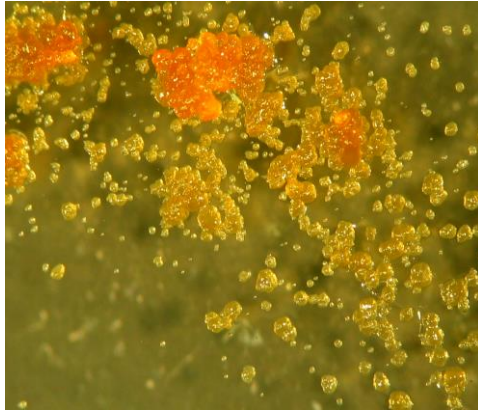


Foto 8. Se indican con flechas colonias de *Streptococcus mutans* de aspecto cristalino y superficie lisa (foto obtenida con lupa estereoscópica Stemi 2000 C, Zeiss).

En las Fotos 9 y 10 se observan las características morfológicas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.



Fotos 9. Colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Se observan colonias cristalinas y de superficie irregular. Nótese el color anaranjado de las colonias correspondientes a esta cepa bacteriana (foto obtenida con lupa estereoscópica Stemi 2000 C, Zeiss).

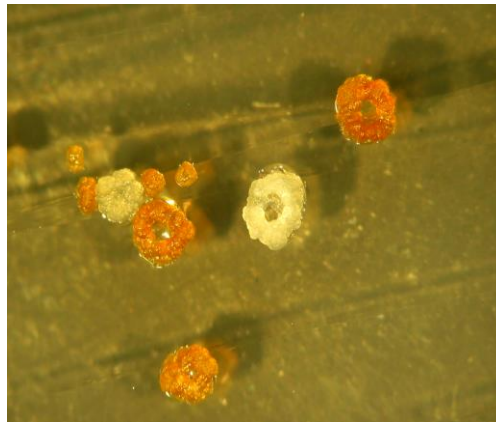


Foto 10. Colonias aisladas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Se observa con mayor aumento colonias de aspecto azucarado y superficie rugosa de color naranja y color crema (foto obtenida con lupa estereoscópica Stemi 2000 C, Zeiss).

Mediante la Tinción de Gram, las colonias aisladas mostraron características microscópicas típicas de *Streptococcus mutans*: formas cocáceas Gram (+), dispuestas en cadenas (Tabla II y Foto 11).

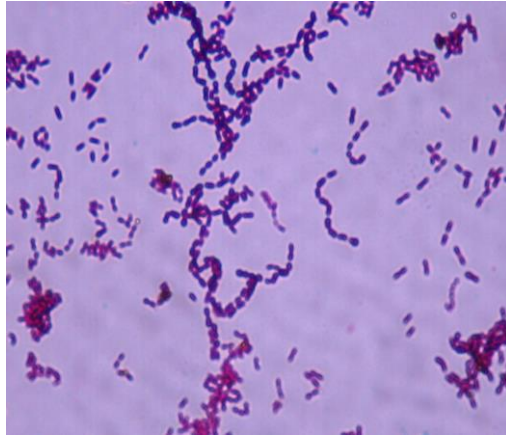


Foto 11. Tinción Gram efectuada a colonias de *Streptococcus mutans* obtenidas desde muestras de saliva. Se observan formas cocáceas Gram (+), dispuestas en cadena (foto obtenida con microscopio, 1000x).

El test de Hidrólisis de Esculina mostró resultados positivos en la mayoría de los aislados estudiados, prueba que permitió definir cuáles de éstos iban a ser utilizados en el estudio (Tabla II y Foto 12).

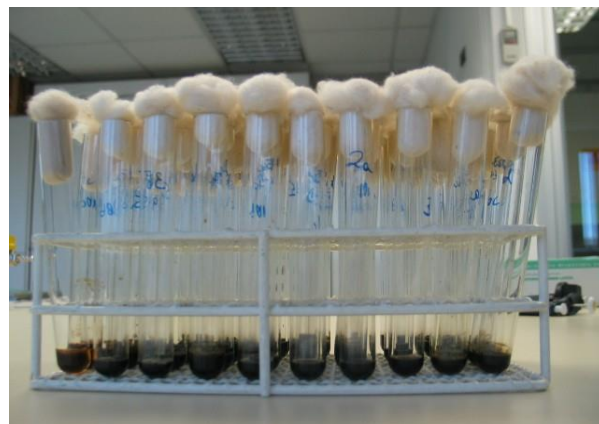


Foto 12. Cultivos de *Streptococcus mutans* a los cuales se realizó el test de Hidrólisis de Esculina. Se observa el color café-negrusco que adquieren los cultivos bacterianos positivos a esta prueba.

II.- Determinación de CIM del propóleo chileno, proveniente de la VIII región, frente a *Streptococcus mutans*.

- a) Ensayo de CIM realizado en agar Mueller-Hinton. En este experimento se consideraron 21 cepas de *Streptococcus mutans* en los resultados, ya que se observó que 15 cepas de dicha especie bacteriana no crecieron en las placas control (en ausencia de propóleo).

En la Tabla III se presenta el efecto de las diferentes concentraciones de propóleo sobre el crecimiento de los aislados clínicos de *Streptococcus mutans*. Se puede observar que el desarrollo de las cepas bacterianas fue inhibido a partir de la concentración de propóleo de 400 µg/ml.

Tabla III. Crecimiento de cepas de *S.mutans* en agar Mueller-Hinton conteniendo diferentes concentraciones de propóleo.

Cepas <i>S.mutans</i>	Concentraciones de propóleo (µg/ml)						Control 2	Alcohol
	Control 1	50	100	200	400	800		
GM-1	+	+	+	+	+	-	+	+
GM-2	+	+	+	+	+	+	+	+
J-3	+	+	+	+	-	-	+	+
J-4	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-5	+	+	+	+	+	+	+	+
MA-6	+	+	+	+	+	+	+	+
JE-8	+	+	+	+	+	+	+	+
S-9	+	+	+	+	-	-	+	+
S-10	+	+	+	+	+	-	+	+
S-11	+	+	+	+	+	+	+	+
S-12	+	+	+	+	+	+	+	+
S-13	+	+	+	+	+	+	+	+
S-14	+	+	+	+	+	+	+	+
S-15	+	+	+	+	+	+	+	+
S-16	+	+	+	+	+	+	+	+
S-17	+	+	+	+	+	+	+	+
B-18	+	+	+	+	+	+	+	+
B-19	+	+	+	+	+	+	+	+
OM-30	+	+	+	+	+	-	+	+
GM-53	+	+	+	+	+	+	+	+
J-55	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : indica que hubo crecimiento bacteriano

- : indica ausencia de crecimiento o hallazgo de 1 colonia

De acuerdo a estos resultados, la CIM determinada para 2 cepas bacterianas fue 400 µg/ml; para 3 cepas bacterianas fue 800 µg/ml. Para las 16 cepas bacterianas restantes se consideró una CIM > 800 µg/ml (Tabla IV).

Tabla IV. CIM del propóleo chileno para las cepas de *S.mutans* estudiadas en el ensayo realizado en agar Mueller- Hinton.

N° Cepas	CIM (µg/ml)
2	400
3	800
16	> 800

A partir de la Tabla IV se deduce que la CIM₅₀ es > 800 µg/ml y, por lo tanto la CIM₉₀ también es > 800 µg/ml.

El alcohol al 55 %, usado como solvente del propóleo, demostró no tener actividad inhibitoria sobre las cepas de *Streptococcus mutans*. (Tabla III). El efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas bacterianas del alcohol y del propóleo se analizó mediante el test de Chi-cuadrado (Tablas V y VI).

Tabla V. Patrón de crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* frente al alcohol al 55% y a la concentración de propóleo de 400 µg/ml en agar Mueller-Hinton.

Cepas <i>S.mutans</i>	Alcohol 55%	Propóleo (400 µg/ml)
Con crecimiento	21*	19*
Sin crecimiento	0*	2*

* N° de cepas.

Al aplicar el test de Chi-cuadrado con la corrección de Yates se obtuvo que $X^2=0,525$, con $p=0,469$. Por lo tanto, no hay diferencia significativa entre el efecto del alcohol al 55% y del propóleo a una concentración de 400 µg/ml sobre el crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans*.

S-13	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
S-14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S-15	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
S-16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
S-17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
B-18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
B-19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MG-21	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
AM-22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LL-23	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LL-24	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MC-25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
IA-26	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
OM-27	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
OM-28	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
OM-29	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
IU-31	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
J-37	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
YI-40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AM-41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C-42	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CR-43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CR-44	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CR-45	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CR-46	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CR-47	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CR-48	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

+: indica que hubo crecimiento bacteriano

-: indica ausencia de crecimiento o hallazgo de 1 colonia

De acuerdo a los resultados presentados, se determinó que la CIM para 25 cepas de *Streptococcus mutans* fue $\leq 12,5$ $\mu\text{g/ml}$. Para las 10 cepas restantes la CIM fue 25 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla VIII).

Tabla VIII. CIM del propóleo chileno para las cepas de *S.mutans* estudiadas en el ensayo realizado en agar TYCS.

N° Cepas	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
25	$\leq 12,5$
10	25

A partir de la Tabla VIII se deduce que la CIM₅₀ es $\leq 12,5$ $\mu\text{g/ml}$ y la CIM₉₀ es 25 $\mu\text{g/ml}$ para *Streptococcus mutans*.

En este ensayo el alcohol al 55% pudo inhibir el crecimiento de 17 cepas de *Streptococcus mutans* (Tabla VII). El efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas bacterianas del alcohol y del propóleo se analizó mediante el test de Chi-cuadrado (Tablas IX y X).

Tabla IX. Patrón de crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* frente al alcohol al 55% y a la concentración de propóleo de 12,5 µg/ml en agar TYCS.

Cepas <i>S.mutans</i>	Alcohol 55%	Propóleo (12,5 µg/ml)
Con crecimiento	18*	10*
Sin crecimiento	17*	25*

* N° de cepas.

Al aplicar el test de Chi-cuadrado se obtuvo que $X^2=2,917$, con $p=0,088$. No hay diferencia significativa entre el efecto inhibitorio del alcohol al 55% y del propóleo a una concentración de 12,5 µg/ml sobre el crecimiento de las cepas de *Streptococcus mutans*. En otras palabras, la inhibición del crecimiento de las cepas de *Streptococcus mutans* es similar tanto al utilizar propóleo a una concentración de 12,5 µg/ml como al utilizar alcohol al 55%.

Tabla X. Patrón de crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* frente al alcohol al 55% y a concentraciones de propóleo ≥ 25 µg/ml en agar TYCS.

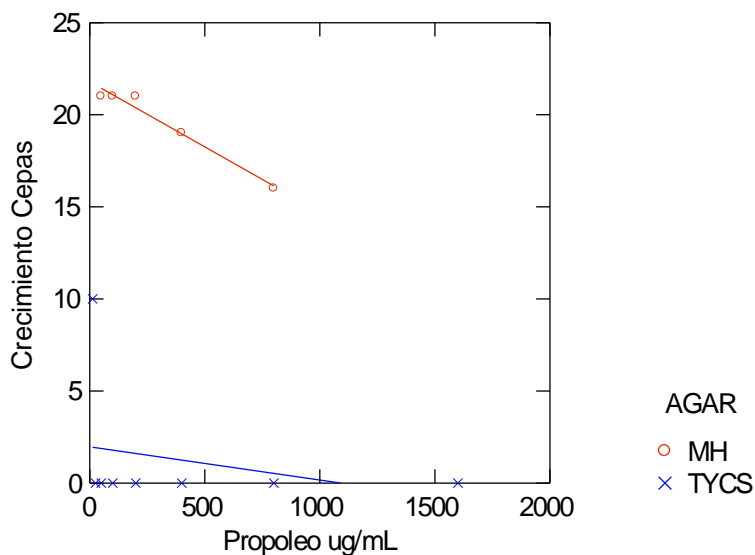
Cepas <i>S.mutans</i>	Alcohol 55%	Propóleo (≥ 25 µg/ml)
Con crecimiento	18*	0*
Sin crecimiento	17*	35*

* N° de cepas.

Al aplicar el test de Chi-cuadrado se obtuvo que $X^2=24,31$, con $p<0,005$. Por lo tanto, sí hay diferencia significativa entre el efecto del propóleo a concentraciones $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ y del alcohol al 55% sobre el crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans*.

En el Gráfico 1 se muestra el análisis de regresión aplicado sobre los resultados obtenidos en los ensayos de CIM en agar Mueller-Hinton y en agar TYCS.

Gráfico 1. Relación entre crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* y concentraciones de propóleo en agar Mueller-Hinton (MH) y agar TYCS.



La ecuación de la recta para el ensayo realizado en agar Mueller-Hinton (MH) es:

$y=21,79 - 0,07 x$. Se obtuvo $r = -0,984$ y $r^2=0,968$. El coeficiente de correlación de Pearson (r) indica que existe una alta asociación negativa entre el crecimiento de las cepas de *Streptococcus mutans* y la concentración de propóleo utilizada. El coeficiente de determinación (r^2) indica que el 96,8% de la variación en el crecimiento de las cepas de *Streptococcus mutans* se debió a la concentración de propóleo utilizada.

La ecuación de la recta para el ensayo realizado en agar TYCS es:

$y=1,967 - 0,002 x$. Se obtuvo $r = -0,282$ y $r^2=0,079$. El coeficiente de correlación de Pearson (r) indica que también existe una correlación lineal negativa entre la variable crecimiento de cepas y la variable concentración de propóleo. Sin embargo, esta asociación no fue alta. El coeficiente de determinación (r^2) indica que sólo el 7,9% de la variación en el crecimiento de las cepas de *Streptococcus mutans* se debió a la concentración de propóleo utilizada. Por lo tanto, existen otras variables que estarían modificando el crecimiento de dichas cepas.

VIII. DISCUSIÓN.

En este trabajo de investigación se comprobó que el propóleo chileno de la VIII región tenía actividad antimicrobiana *in vitro*, frente a *Streptococcus mutans*. En el ensayo realizado en agar Mueller-Hinton se determinó una CIM₅₀ y CIM₉₀ >800 µg/ml, mientras que en el ensayo realizado en agar TYCS se determinó una CIM₅₀ ≤12,5 µg/ml y una CIM₉₀=25 µg/ml

Por otro lado, al investigar el efecto del alcohol al 55%, utilizado como solvente del propóleo, se observó que tuvo algún efecto inhibitorio sobre cepas de *Streptococcus mutans*, sin embargo, dicho efecto fue significativamente menor al mostrado por el propóleo a concentraciones ≥ 25 µg/ml

Al realizar un análisis de regresión entre las concentraciones de propóleo probadas y el crecimiento bacteriano se obtuvo una recta con poca pendiente, en el caso del ensayo realizado en agar TYCS (Gráfico 1). Esto se debe al fuerte efecto inhibitorio del propóleo sobre *Streptococcus mutans*, ya que, a partir de la menor concentración probada (12,5 µg/ml) se comenzó a observar inhibición del crecimiento de la mayoría de las cepas bacterianas y, a la siguiente concentración (50 µg/ml), la inhibición fue completa.

La situación inversa ocurrió en el ensayo realizado en agar Mueller-Hinton, observándose inhibición del crecimiento bacteriano a partir de los 400 µg/ml de propóleo, de manera gradual.

El coeficiente de determinación ($r^2=0,079$) obtenido para el ensayo realizado en agar TYCS indica que existirían otras variables que estarían influenciando el crecimiento de

Streptococcus mutans, además de la variable concentración. Entre esas variables podrían considerarse tanto la composición del medio de cultivo como el metabolismo bacteriano.

La actividad de los biocidas puede ser influenciada por la composición del medio de cultivo, por lo cual se ha estandarizado el uso de agar Mueller-Hinton para los ensayos de susceptibilidad. En este estudio, esto mismo podría explicar los diferentes valores de CIM obtenidos para propóleo, al realizar los ensayos en agar TYCS, respecto del agar Mueller-Hinton. Algo similar se observó para alcohol al 55%, probado en ambos medios de cultivo⁽⁴⁰⁾.

El agar Mueller-Hinton es un medio de cultivo con alto contenido proteico (carne deshidratada y caseína hidrolizada) y 0,15% de almidón (Difco), que se sugiere suplementar con sangre de oveja al 5% para el cultivo de *Streptococcus mutans*⁽³⁵⁾. Al igual que ocurría con la actividad antimicrobiana de la flavomicina, que disminuía al existir proteínas particulares en el medio de cultivo⁽⁴¹⁾, es probable que el propóleo haya interactuado con algún componente proteico de este medio de cultivo, cuyo efecto fue disminuir su actividad. Más aún, se ha observado que la sangre también puede disminuir la actividad de algunos antibacterianos, lo que podría haber ocurrido con el propóleo^(40,41).

El agar TYCS es un medio de cultivo elaborado especialmente para el crecimiento de *Streptococcus mutans*⁽³⁶⁾. Uno de sus componentes es la sacarosa (5%), que es un nutriente importante para el metabolismo de *Streptococcus mutans*. La sacarosa está involucrada en la vía de obtención de energía por parte de esta bacteria, cuyo producto final es el ácido láctico⁽³⁾. Además, a partir de este disacárido, *Streptococcus mutans* sintetiza glucanos, polímeros extracelulares que sirven para su adherencia y acumulación, y polímeros intracelulares, parecidos al glicógeno⁽⁴⁾. Por lo tanto, es de suponer que en agar TYCS

Streptococcus mutans poseería un metabolismo más activo, que favorecería la acción inhibitoria del propóleo.

Por otra parte, los valores de CIM obtenidos en esta investigación difieren de aquéllos obtenidos por otros investigadores, entre los cuáles también hay diferencias importantes, ya que, para *Streptococcus mutans*, se han descrito CIM de 50 µg/ml , de 100 µg/ml y de 400 µg/ml. Las diferencias observadas, se pueden deber a que los propóleos difieren en su composición química, de acuerdo a su origen geográfico, lo que a su vez determina sus propiedades biológicas^(5,6,28). De los propóleos estudiados en Brasil, se ha visto que el proveniente de Rio Grande do Sul tiene marcados efectos inhibitorios sobre las glucosiltransferasas del grupo mutans streptococci, además de inhibir el crecimiento de dichos microorganismos, y mayor capacidad de reducir lesiones cariosas en ratas. Al comparar su composición química con otros propóleos se observó que éste tenía mayores concentraciones de pinocembrina, galangina, apigenina y acacetina (flavonoides)^(5,6,8). Además, se ha investigado la acción de diferentes compuestos químicos encontrados en los propóleos brasileños sobre las glucosiltransferasas de mutans streptococci y sobre el crecimiento de dichas especies bacterianas (*Streptococcus milleri*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*). Se verificó que los flavonoides eran los compuestos más activos entre los estudiados. Flavonas y flavonoles inhibieron efectivamente las glucosiltransferasas; flavanonas y el dihidroflavonol pinobanksin-3-acetato mostraron actividad antibacteriana. La apigenina (flavona) fue el compuesto más efectivo para inhibir las glucosiltransferasas. Los derivados del ácido cinámico no tuvieron efecto sobre ninguno de los parámetros estudiados. El tt-farnesol (terpenoide) fue el agente antibacteriano más efectivo⁽⁹⁾.

IX. CONCLUSIONES

Se comprobó que el propóleo chileno, proveniente de la VIII región, inhibe el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*. Observamos que la CIM del propóleo chileno frente a *Streptococcus mutans* mostró variaciones según el medio de cultivo utilizado, siendo menor al utilizar agar TYCS que al utilizar agar Mueller-Hinton suplementado con sangre. Por lo tanto, es probable que el propóleo pudiese haber interactuado con algún componente del agar Mueller-Hinton o de la sangre, y esto hubiese disminuido su acción antibacteriana. Por otro parte, es posible que en el agar TYCS, *Streptococcus mutans* presente un metabolismo más activo, hecho que favorecería la actividad antimicrobiana del propóleo.

Vale también mencionar la gran utilidad del replicador de Steer en este trabajo, ya que permite sembrar, simultáneamente, más de treinta aislados bacterianos. De manera que el estudio de la actividad antimicrobiana de un biocida determinado frente a varias cepas o especies bacterianas se realiza en forma eficiente.

X. SUGERENCIAS

La determinación de los componentes químicos del propóleo chileno, proveniente de la VIII región, podría aclararnos cuáles de ellos son los responsables de sus propiedades biológicas y además se podría determinar su posible interacción con algunos componentes del agar Mueller-Hinton suplementado con sangre.

Se requieren posteriores investigaciones *in vitro* para determinar cuáles componentes del agar Mueller-Hinton interactúan con el propóleo chileno de la VIII región y la influencia de la sangre sobre su actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*. Además, sería de gran utilidad investigar la actividad antimicrobiana de propóleo frente a *Streptococcus mutans* en agar Mueller-Hinton y en agar TYCS, de diferentes marcas comerciales, como también realizar este mismo estudio pero con propóleo de diferente origen, mediante el método de Dilución en Agar. Esto permitiría determinar, tanto el medio de cultivo para realizar este método, como el tipo de propóleo más adecuado para utilizar como biocida.

Por último y como sugerencia más importante, se recomienda realizar investigaciones *in vivo* para evaluar clínicamente el efecto y la posible utilización del propóleo como un agente preventivo de la caries dental.

XI. RESUMEN

El principal agente etiológico de la caries dental en humanos es *Streptococcus mutans*. En varias investigaciones se ha corroborado la actividad antibacteriana del propóleo, una sustancia resinosa producida por las abejas, frente a este microorganismo. En un estudio *in vitro*, previo a éste, se comprobó que un tipo de propóleo chileno, proveniente de la VIII región, tenía propiedades antibacterianas frente a dicha especie bacteriana. En la presente investigación se determinó *in vitro* la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de este propóleo sobre *Streptococcus mutans*, mediante el método de Dilución en Agar. Se utilizaron dos medios de cultivo: agar Mueller-Hinton suplementado con sangre y agar TYCS. En el ensayo realizado en agar Mueller-Hinton se determinó valores de CIM₅₀ y de CIM₉₀ mayores a 800 µg/ml; en el ensayo realizado en TYCS se obtuvo una CIM₅₀ ≤12,5 µg/ml y una CIM₉₀=25 µg/ml. Se postula que el propóleo podría haber interactuado con algún componente del agar Mueller-Hinton o que podría haber sido inactivado por la presencia de sangre en este medio. Por otro lado, es posible que en el agar TYCS *Streptococcus mutans* tenga un metabolismo más activo que favorecería la actividad antimicrobiana del propóleo. Sin embargo, se requieren futuras investigaciones para determinar el medio de cultivo más indicado para investigar la CIM del propóleo frente a *Streptococcus mutans* a través de dicho método.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brown, P., Nicolini, S., y Onetto, J.E. Caries. Valparaíso, Ediciones de la Universidad de Viña del Mar, 1991. 148 p. p.15-36, Cap.2; p.140-147, Cap.11.
2. Bowen ,W.H. Wither or wither caries research? Caries Res 1999; 33: 1-3.
3. Loesche, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986; 50:353-380.
4. Balakrishnan, M., Simmonds, R.S. y Tagg, J.R. Dental caries is a preventable infectious disease. Aust Dent J 2000; 45:4.
5. Koo, H. et al. Effect of *Apis mellifera* propolis from two brazilian regions on caries development in desalivated rats. Caries Res 1999; 33:393-400.
6. Koo, H. et al. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. Caries Res 2000; 34(5): 361-442.
7. Ikeno, K., Ikeno, T., Miyazawa, C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res 1991; 25:347-351.
8. Park, Y.K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. Curr Microbiol 1998; 36: 24-28.
9. Koo, H. et al. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(5):1302-1309.
10. Duarte, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Biol Pharm Bull 2003; 26(4): 527-531.

11. Chile. Ministerio de Salud. Evaluación Plan Nacional de Salud Bucodental 1990-1999. Santiago, Chile. División de Salud de las Personas, Departamento Odontológico. 147 p. p. 136-144.
12. Huerta, J., Hernández, A., Martínez de Pinillos, M. Principios de microbiología bucal. Microbiología y prevención de caries, paradenciopatías y otras enfermedades infecciosas orales. Santiago, Chile, Ediciones de la Universidad de Chile. 1975. 194 p. p. 23-36, 42-45, 55-58.
13. Miller, W.D. The micro-organisms of the human mouth. Philadelphia, The S.S. White Manufacturing Co., 1890.
14. Urzúa, I., Stanke, F., Mariné, A. Nuevas estrategias en cariología. Factores de riesgo y tratamiento. Santiago, Chile, Ediciones Arancibia, 1999. 125 p. p.13-30; 39-45; 50-52; 59-61.
15. Keyes, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. Arch Oral Biol 1960; 1:304-320.
16. Marsh, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res 2004; 38:204-211.
17. Yoshida, A., Kuramitsu, H.K. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2002; 68(12) :6283-6291.
18. Mandel, I. D. Dental plaque: nature, formation and effects. J Periodont 1966; 37:357-367.
19. Scheie, A.A. Mechanisms of dental plaque formation. Adv Dent Res 1994; 8(2):246-253.
20. Li, J. et al. Identification of *in vivo* pellicle constituents by analysis of serum immune responses. J Dent Res 2004; 83(1):60-64.

21. Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C. Physicochemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* 1997; 11(1):24-32.
22. Schele, A.A., Petersen, F.C. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(1):4-12.
23. Schilling, K. M., Bowen, W.H. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1992; 60(1):284-295.
24. Koo, H. et al. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res* 2002;36 (6): 445-449.
25. Yamashita, Y. et al. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun* 1993; 61(9):3811-3817.
26. Stephan, R.M. Intraoral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. *J Dent Res* 1944; 23:257-266.
27. Fitzgerald, R.J., Keyes, P.H. Demonstration of the ecologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc* 1960; 61:9-19.
28. Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A. El própolis y la salud. *Ars Pharm* 2004; 45(1):21-43.
29. Stepanovic, S. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* 2003;158(4):353-355.
30. Callejo, A. et al. Hipersensibilidad a propóleos. *Alergol Inmunol Clin* 2001; 16:113-117.
31. Gispert, A. et al. Actividad anticaries de una crema dental con propóleos. *Rev Cubana Estomatol* 2000; 37(3):166-70.

32. Gispert, A.E. et al. Estudio comparativo del efecto del cepillado con una crema dental con propóleos rojos y de un gel con clorofila. *Rev Cubana Estomatol* 1998; 35(3):112-118.
33. Koo, H. et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* Propolis on mutans streptococci. *Curr Microbiol* 2000; 41: 192-196.
34. Fajuri, M., Huerta, J. y Silva, N. Eficacia del propóleo chileno como antimicrobiano contra microorganismos de interés en odontología. Tesis para optar al Título de Cirujano-Dentista. Universidad de Chile, Facultad de Odontología, 2004.
35. XVII Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra. Alicia Rossi”. XII Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina, 2003. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, 2003. 295 p. p 11, 76, 95-104.
36. Van Palenstein Helderman, W.H., Ijsseldijk, M. y Huis In' T Veld, J.H.J. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. *Archs Oral Biol* 1983; 28(7):599-603.
37. Edberg, S.C. et al. Rapid spot test for the determination of esculin hydrolysis. *J Clin Microbiol* 1976; 4(2) :180-84.
38. Beighton, D., Russell, R.R.B., y Whiley, R.A. A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1991; 25:174-178.
39. Norman, G., Streiner, D. Bioestadística. Madrid, Mosby/Doyma, 1996. 260 p. p 100-107, Capítulo12; p 150-152, Capítulo 16.

40. Butaye, P., Devriese, L.A. y Haesebrouck, F. Effects of different test conditions on MIC's of food animal growth-promoting antibacterial agents for Enterococci. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7):1907-1911.
41. Butaye, P., Devriese, L.A. y Haesebrouck, F. Influence of different medium components on the in vitro activity of the growth-promoting antibiotic flavomycin against enterococci. *J Antim Chem* 2000; 46:713-716.