



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO DE ODONTOLOGÍA

Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de la terapia fotodinámica sobre
Streptococcus mutans (ATCC® 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®
10556) en presencia y ausencia de riboflavina

TESIS

Para optar el título profesional de Cirujano Dentista

AUTORES

Munive Mendez, Maria Claudia del Pilar (0000-0001-5744-8656)

Cardenas Quispe, Flavia Jimena (0000-0003-1765-4951)

ASESORES

Del Valle Mendoza, Juana Mercedes (0000-0002-6011-5040)

Aguilar Luis, Miguel Angel (0000-0001-7023-3190)

Lima, 25 de Febrero de 2020

DEDICATORIA

Dedicado a mi querida madre, Pilar Mendez Monge, por brindarme su apoyo incondicional y su infinito amor.

A mi padre, Arnaldo Munive Degregori, por motivarme con sus sabias palabras.

A mi hermano, Arnaldo Munive Mendez, por enseñarme a ser optimista.

A Gary Talledo Salas, por estar siempre presente para mí.

María Claudia del Pilar Munive Mendez

Dedicado a mis padres, Manolo Cardenas Ruiz y Miriam Quispe Solis, por su apoyo y compañía durante todo el proceso de mi formación profesional.

A Ronny Valladares Hernández por su apoyo incondicional y motivación para continuar adelante.

Flavia Jimena Cardenas Quispe

AGRADECIMIENTOS

A Dios por siempre iluminarnos en nuestro camino al éxito.

A nuestros padres y hermanos por su constante apoyo en nuestro desarrollo personal y profesional.

A nuestros asesores Juana del Valle, Miguel Ángel Aguilar y Leslie Casas por su tiempo y sus consejos para mejorar en esta etapa.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto inhibitorio de la terapia fotodinámica (TPD) con Diodo Emisor de Luz (LED) azul sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* en presencia y ausencia de riboflavina (E - 101).

Materiales y métodos: Se realizaron cuatro tratamientos en presencia y ausencia de la exposición de luz LED azul y riboflavina al 0.5% sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Las bacterias fueron cultivadas en medio BHI y la unidad de medida utilizada fue las unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

Resultados: La fotoactivación con luz LED azul a 40 segundos no tuvo efecto inhibitorio sobre *S. mutans* y *S. sanguinis*. Sin embargo, al realizar la terapia fotodinámica en presencia de riboflavina, se observó que el crecimiento bacteriano fue menor ($p < 0.05$). Asimismo, se identificó que la viabilidad bacteriana de *S. sanguinis* es menor que la de *S. mutans*, con un 40% y 66% respectivamente.

Conclusiones: Se concluye que la riboflavina tiene un efecto inhibitorio significativo sobre la viabilidad bacteriana de *S. mutans* y *S. sanguinis*.

Palabras clave: terapia fotodinámica; riboflavina; efecto inhibitorio; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sanguinis*.

In vitro evaluation of the inhibitory effect of photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556) in presence and absence of riboflavin

ABSTRACT

Objective: To evaluate the inhibitory effect of photodynamic therapy (TPD) with blue Light Emitting Diode (LED) on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in presence and absence of riboflavin (E-101).

Materials and methods: Four treatments were performed in presence and absence of blue LED and riboflavin (0.5%) exposure on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. The bacteria were grown in BHI medium and the unit of measurement used was the colony forming units (CFU / ml).

Results: Photoactivation with blue LED light at 40 seconds had no inhibitory effect on *S. mutans* and *S. sanguinis*. However, when performing photodynamic therapy in presence of riboflavin, it was observed that bacterial growth was lower ($p < 0.05$). Likewise, it was identified that bacterial viability of *S. sanguinis* is lower than *S. mutans*, with 40% and 66% respectively.

Conclusions: It is concluded that riboflavin has a significant inhibitory effect on the bacterial viability of *S. mutans* and *S. sanguinis*.

Keywords: photodynamic therapy; riboflavin; inhibitory effect; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sanguinis*.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3	RESULTADOS	7
4	DISCUSIÓN.....	11
5	CONCLUSIÓN	14
6	REFERENCIAS	15

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los tratamientos de luz LED azul y riboflavina al 0.5% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATTC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATTC®10556)..... 5

Tabla 2. Comparación del efecto inhibitorio de la riboflavina al 0.5% y luz LED azul sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATTC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATTC®10556) 8

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. . Viabilidad bacteriana (%) de la cepa de Streptococcus mutans (ATTC®25175) y Streptococcus sanguinis (ATTC®10556) frente a los tratamientos de riboflavina al 0.5% y de luz LED azul	9
--	---

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Viabilidad bacteriana (UFC) de las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATTC®25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATTC®10556) frente a los tratamientos de riboflavina al 0.5% y de luz LED azul	10
---	----

1 INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad que se caracteriza por ser multifactorial, crónica y prevenible, en la que interactúan como factores causales: la dieta, el tiempo, el huésped y los microorganismos presentes en la cavidad oral.⁽¹⁻⁵⁾ Este último factor comprende una gran variedad de bacterias presentes naturalmente en la composición de la saliva que generan la producción de ácidos perjudiciales produciendo la desmineralización del tejido dentario y como consecuencia el desarrollo de lesiones cariosas.⁽²⁻⁵⁾ Entre las principales bacterias relacionadas a la etiología de la caries dental, destacan el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*.^(2,4,5) Ambos microorganismos son bacterias Gram positivas y anaerobias facultativas. Por un lado, *S. mutans* es productora de ácido láctico y colonizadora secundaria del biofilm dental.^(2,4,5) Por otro lado, *S. sanguinis* se suele encontrar en la cavidad oral después de la erupción de los dientes y se encarga de la formación de la placa dental ya que se adhiere a la saliva interactuando con las proteínas: inmunoglobulina A y la alfa amilasa. Además, es considerada como la colonizadora primaria del biofilm.^(4,5) Por esta razón, teniendo en cuenta que *S. sanguinis* se encarga de la colonización primaria del biofilm, esta permite la adhesión de otras bacterias como *S. mutans* para la formación de patologías tales como: caries dental y periodontitis.⁽⁵⁾

En la actualidad, se registran diversas investigaciones sobre la terapia fotodinámica (TPD) que evalúan el efecto inhibitorio de microorganismos expuestos a luz LED azul y un fotosensibilizante modificando variables tales como: la intensidad, temperatura, tiempo y ambientes.⁽⁶⁻²³⁾ Con respecto al efecto inhibitorio, este se conoce como la capacidad que presenta una o más sustancias para detener o eliminar la acción de un patógeno. Para su medición, existen diversos métodos que evalúan el efecto inhibitorio de una sustancia sobre cepas bacterianas. Por ejemplo, el método de difusión (Kirby y Bauer, Epsilon Test) que utiliza discos para medir halos de inhibición o tiras de un tratamiento para evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI); y el método de dilución (agar, caldo) que somete las bacterias previamente a tratamientos para realizar el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).⁽²⁴⁾

Se han estudiado diversos tratamientos para disminuir la proliferación bacteriana sin riesgo a generar toxicidad, un ejemplo de ello es la terapia fotodinámica. Este es un tipo de

tratamiento por medio del cual reaccionan tres componentes específicos tales como: la luz, moléculas de oxígeno y un fotosensibilizante, que tiene como resultado inactivar o interrumpir la función celular.^(21,23-25) Los fotosensibilizantes son medicamentos que se activan en contacto con la luz y provocan destrucción celular, pueden ser tóxicos o no tóxicos.^(7,8) El fotosensibilizante no tóxico utilizado en este estudio fue la riboflavina (RF), vitamina perteneciente al complejo B.⁽²³⁾ La riboflavina es una sustancia amarilla y cristalina que actúa como coenzima durante el proceso de oxidación (pérdida de electrones por reacciones químicas), ampliamente utilizada en el área de oftalmología por su acción sobre el colágeno tipo I.⁽²⁸⁻³⁰⁾ Es decir, la riboflavina no solo es beneficiosa por su acción como fotosensibilizante sino también para enredar las fibras de colágeno a nivel dentinario.⁽⁵⁾ Por esta razón, se han realizado estudios donde relacionan su presencia con otras variables como la luz, en el que se ha comprobado su efecto inhibitorio sobre bacterias como *Staphylococcus aureus*.^(11,19,22-23)

La importancia del presente estudio radica en lograr el manejo de uno de los factores más importantes que intervienen en la etiología de la lesión cariosa: el factor microbiológico.⁽³³⁻³⁵⁾ Debido al desequilibrio en la flora bacteriana en los pacientes diagnosticados con alto riesgo a caries, se requieren medidas extras a la higiene dental sugerida, tales como la terapia fotodinámica que podría devolver el equilibrio microbiológico en la cavidad oral.

Se observa que existe poca evidencia referente a la acción inhibitoria de las lámparas de fotocurado dental como terapia fotodinámica a pesar que trabajan con una longitud de onda similar a la probada en las investigaciones previas que confirman la inhibición bacteriana de la luz azul en presencia de un fotosensibilizante.^(36,37) Por lo tanto, en el presente estudio se implementó la luz LED azul de la lámpara de fotocurado dental durante 40 segundos por ser el mayor rango de tiempo de trabajo utilizado para los tratamientos dentales. Asimismo, se evaluó el efecto de la terapia fotodinámica en presencia y ausencia de riboflavina (vitamina B2) sobre dos principales cepas bacterianas que se encuentran en la cavidad oral relacionadas a la formación de caries dental.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo experimental *in vitro*. Se utilizó el método de suspensión directa de colonias para las cepas de *S. mutans* y *S. sanguinis* en presencia y ausencia de riboflavina al 0.5% y luz LED azul durante 40 segundos (Tabla 1). Como control se utilizaron cepas bacterianas de *S. mutans* y *S. sanguinis* sin ningún tratamiento y medio de cultivo *Brain Heart Infusion* (BHI) agar con riboflavina al 0.5%. Para cada tratamiento se realizaron 9 repeticiones y los ensayos se realizaron en paralelo para ambas cepas bacterianas.

Cepas bacterianas

Las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556) fueron obtenidas comercialmente (Microbiologics Inc, Minnesota, USA). Los cultivos bacterianos fueron realizados siguiendo las instrucciones del fabricante. Para lo cual, se utilizó el medio de cultivo *Brain Heart Infusion* (BHI) agar (Oxoid, Hampshire, UK). Los cultivos fueron incubados a 35°C en condiciones aeróbicas durante 24 horas.

Riboflavina

La riboflavina (lactoflavina, vitamina B2, vitamina G) fue obtenida comercialmente (Ref #R4500-100G, Sigma-Aldrich Inc., Missouri – St. Louis, USA). Para los experimentos se utilizó riboflavina (B2) a una concentración final de 0.5%.

Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica fue realizada por medio de una lámpara de luz LED azul de fotocurado dental, la cual fue obtenida comercialmente (Woodpecker LED B, Guilin Woodpecker Medical Instrument Co., Information Industrial Park, National High-Tech Zone, Guilin, Guangxi, 541004 P.R. China). Previo a los experimentos, la

lámpara de fotocurado dental fue calibrada con un radiómetro registrando su potencia ($P = 1200\text{mW/cm}^2$). Por otro lado, se registró la intensidad ($I = 100\text{mW/cm}$), la longitud de onda ($\lambda=420\text{nm} - 480\text{nm}$) y los tiempos de trabajo (5, 10, 15 y 20 segundos) según la información brindada por el fabricante. Se implementó dos veces el tiempo de trabajo de 20 segundos dando como resultado final 40 segundos de exposición de luz LED azul por tratamiento.

Evaluación de la viabilidad bacteriana de *S. mutans* y *S. sanguinis* y el efecto inhibitorio de la terapia fotodinámica

La determinación de la viabilidad bacteriana de las cepas de *S. mutans* y *S. sanguinis* se realizó en presencia y ausencia de riboflavina al 0.5% y luz LED azul durante 40 segundos. La unidad de medida estuvo conformada por el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

Para lo cual, se utilizaron placas de BHI agar (previo control de calidad a 37°C durante 72 horas). En paralelo, se prepararon suspensiones bacterianas de *S. mutans* y *S. sanguinis* en caldo BHI con concentraciones iniciales de 7.7×10^3 UFC/ml y 2.3×10^4 UFC/ml, respectivamente.

El experimento consistió en cuatro tratamientos en combinación con la riboflavina al 0.5% (B2) y la terapia fotodinámica (40 segundos) para ambas cepas bacterianas de manera independiente. Para cada tratamiento se realizaron 9 repeticiones utilizando un volumen de 20µl de suspensión bacteriana por placa de BHI agar, cultivadas a 35°C en condiciones aeróbicas durante 24-48 horas.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos de luz LED azul y riboflavina al 0.5% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556).

	Ausencia de luz LED azul		Presencia de luz LED azul	
	T1	T2	T3	T4
<i>S. mutans</i> (ATCC®25175)	<i>S. mutans</i> (1000 µl)	<i>S. mutans</i> (996 µl) + riboflavina (4 µl)	<i>S. mutans</i> (1000 µl)	<i>S. mutans</i> (996 µl) + riboflavina (4 µl)
<i>S. sanguinis</i> (ATCC®10556)	<i>S. sanguinis</i> (1000 µl)	<i>S. sanguinis</i> (996 µl) + riboflavina (4 µl)	<i>S. sanguinis</i> (1000 µl)	<i>S. sanguinis</i> (996 µl) + riboflavina (4 µl)

Leyenda:

- T1: Grupo control de *S. mutans* y *S. sanguinis*
- T2: *S. mutans* y *S. sanguinis* en presencia de riboflavina al 0.5%
- T3: *S. mutans* y *S. sanguinis* expuesta a luz LED azul durante 40 segundos
- T4: *S. mutans* y *S. sanguinis* en presencia de riboflavina al 0.5% y expuesta a luz LED azul durante 40 segundos

Análisis de datos

Se obtuvo la estadística descriptiva de las variables numéricas y categóricas (media, mediana, desviación estándar y rango intercuartílico). Se comparó el efecto inhibitorio de la riboflavina y luz LED azul sobre cepas de *S. mutans* y *S. sanguinis* mediante la prueba de *Kruskal Wallis*. Posteriormente, se identificó los grupos que presentaban diferencias significativas mediante la prueba *Kruskal Wallis Post-Hoc after Nemenyi*.

Consideraciones éticas y lugar de ejecución

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación (CEE) de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (carta Nro. PI158-18). La ejecución fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC)-Instituto de Investigación Nutricional (IIN).

3 RESULTADOS

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de la terapia fotodinámica con Diodo Emisor de Luz (LED) azul en presencia y ausencia de riboflavina (E-101) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556). Según lo observado se identificó que la fotoactivación no presenta un efecto inhibitorio sobre cepas de *S. mutans* y *S. sanguinis*. Sin embargo, los tratamientos con riboflavina al 0.5% sí muestran un efecto inhibitorio sobre ambas cepas bacterianas.

En la tabla 2, se comparó *S. mutans* y *S. sanguinis* según cada tratamiento realizado y se observó que la riboflavina al 0.5%, independientemente de la exposición a la luz LED azul, ejerce un efecto inhibitorio significativo en el número de bacterias viables con valores de p menor a 0.001 y 0.001, respectivamente. Mientras que en el tratamiento en ausencia de riboflavina al 0.5%, independientemente de la exposición a la luz LED azul, se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa (Tabla 2) (Figura 1).

En el gráfico 1, se observa que cepas de *S. mutans* y *S. sanguinis* muestran una viabilidad bacteriana de 66% y 40% respectivamente, únicamente en presencia de riboflavina al 0.5%. Mientras que en el tratamiento de riboflavina al 0.5% y luz LED azul se observa una viabilidad de 68% y 44% respectivamente (Gráfico 1). Cabe resaltar, que la presencia de riboflavina tuvo un mayor efecto inhibitorio sobre cepas de *S. sanguinis* en comparación a las cepas de *S. mutans*. Además, se evidenció que la terapia fotodinámica no ejerce inhibición en presencia o ausencia de riboflavina sobre los microorganismos utilizados en el presente estudio.

Tabla 2. Comparación del efecto inhibitorio de la riboflavina al 0.5% y luz LED azul sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATTC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATTC®10556).

Microorganismo	Tratamiento	Media	Mediana	Desviación estándar	Rango intercuartílico	<i>p</i> *
<i>S. mutans</i>	R- / LED-	2.3 x 10 ⁴	2.3 x 10 ⁴ ^a	0.1 x 10 ⁴	0.1 x 10 ⁴	<0.001
	R+ / LED-	1.5 x 10 ⁴	1.6 x 10 ⁴ ^b	0.2 x 10 ⁴	0.1 x 10 ⁴	
	R- / LED+	2.2 x 10 ⁴	2.3 x 10 ⁴ ^a	0.2 x 10 ⁴	0.1 x 10 ⁴	
	R+ / LED+	1.5 x 10 ⁴	1.5 x 10 ⁴ ^b	0.3 x 10 ⁴	0.2 x 10 ⁴	
<i>S. sanguinis</i>	R- / LED-	7.8 x 10 ³	7.3 x 10 ³ ^a	2 x 10 ³	3.9 x 10 ³	0.001
	R+ / LED-	3.1 x 10 ³	3.4 x 10 ³ ^b	1.1 x 10 ³	0.9 x 10 ³	
	R- / LED+	7.5 x 10 ³	9 x 10 ³ ^a	2.1 x 10 ³	2.9 x 10 ³	
	R+ / LED+	3.5 x 10 ³	3.6 x 10 ³ ^b	0.5 x 10 ³	0.9 x 10 ³	

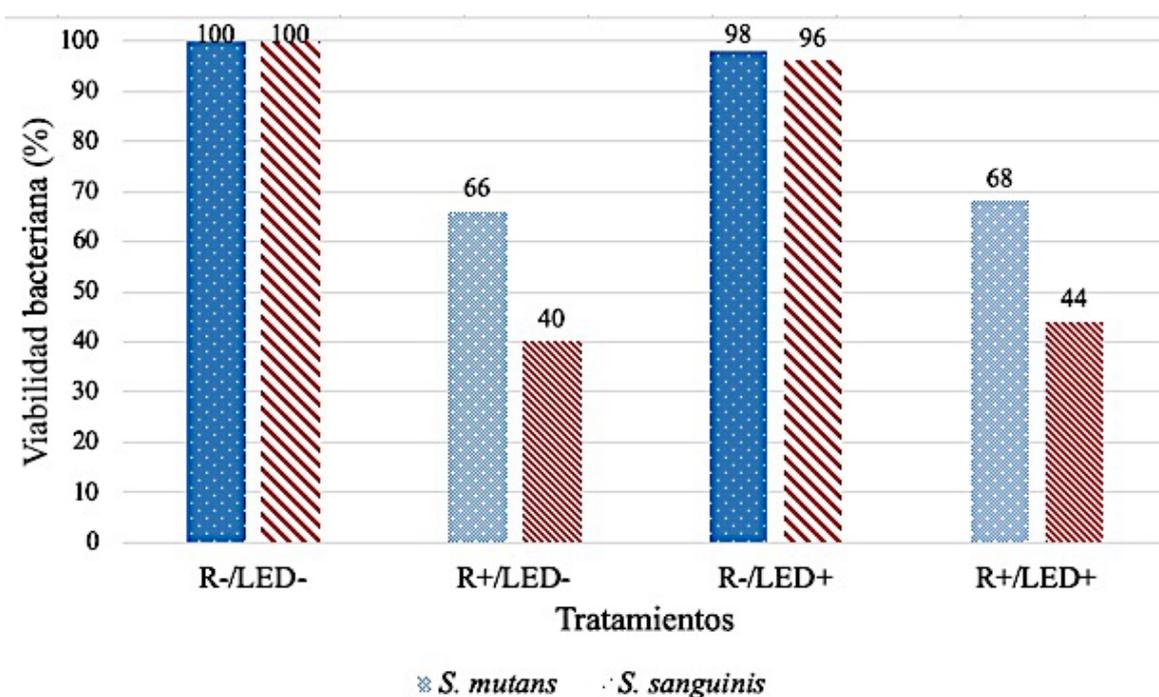
*Prueba de Kruskal-Wallis (nivel de significancia estadística $p < 0.05$)

^{a,b} Prueba de Kruskal Wallis Post-Hoc after Nemenyi. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas. Unidad de medida: unidades formadoras de colonia (UFC)

Leyenda:

- R- : Ausencia de riboflavina al 0.5%
- R+ : Presencia de riboflavina al 0.5%
- LED-: Ausencia de luz LED azul
- LED+: Presencia de luz LED azul durante 40 segundos

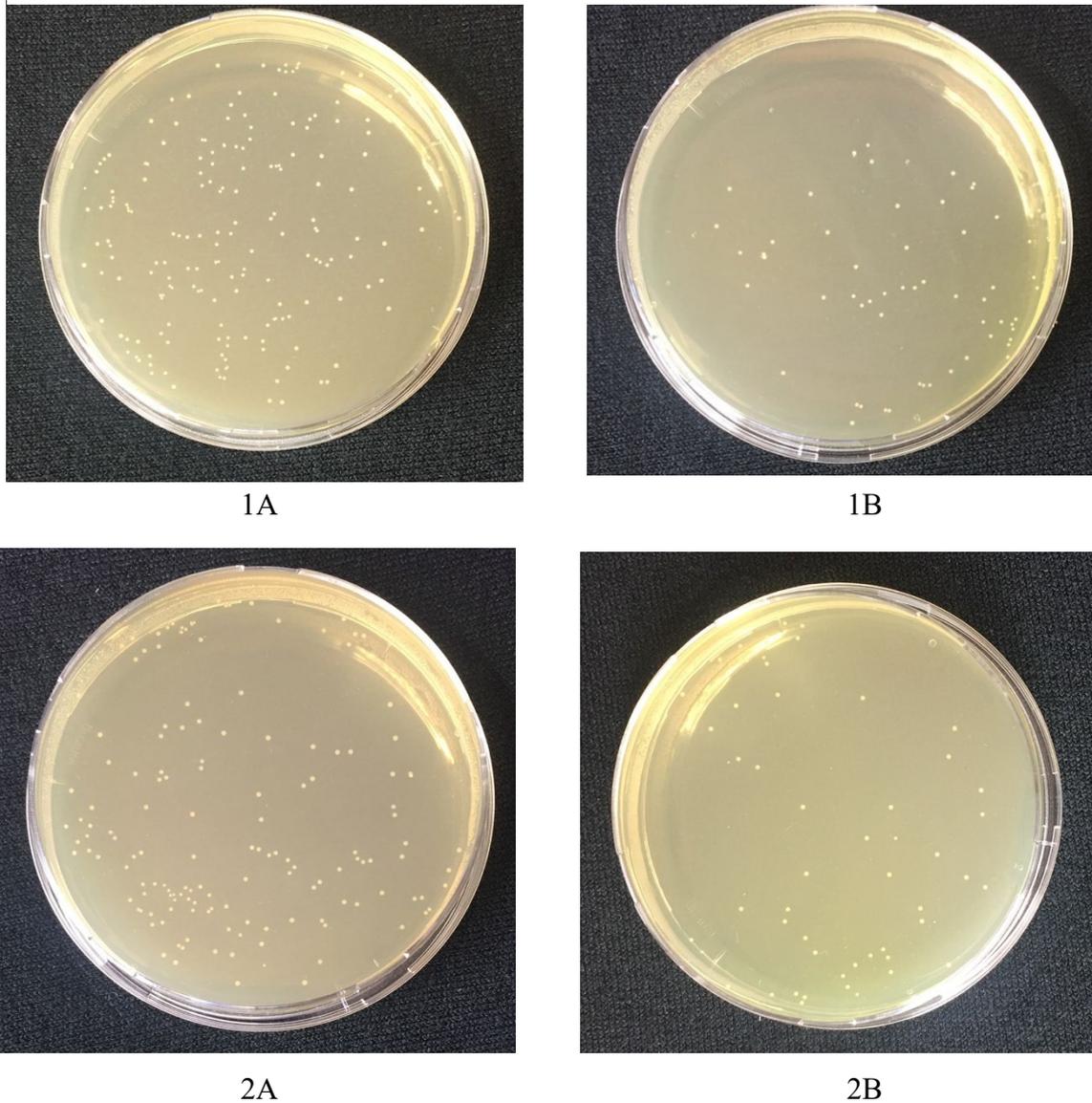
Gráfico 1. Viabilidad bacteriana (%) de las cepas de *Streptococcus mutans* (ATTC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATTC®10556) frente a los tratamientos de riboflavina al 0.5% y de luz LED azul



Leyenda:

- R- : Ausencia de riboflavina al 0.5%
- R+ : Presencia de riboflavina al 0.5%
- LED-: Ausencia de luz LED azul
- LED+ : Presencia de luz LED azul durante 40 segundos

Figura 1. Viabilidad bacteriana (UFC) de las cepas de *Streptococcus mutans* (ATTC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATTC®10556) frente a los tratamientos de riboflavina al 0.5% y de luz LED azul



Leyenda:

- 1A: Placa Petri con BHI agar con cultivo de las cepas de *S. mutans*
- 1B: Placa Petri con BHI agar con cultivo de las cepas de *S. mutans* expuestas a TPD (riboflavina al 0.5% y luz LED azul durante 40 segundos)
- 2A: Placa Petri con BHI agar con cultivo de las cepas de *S. sanguinis*
- 2B: Placa Petri con BHI agar con cultivo de las cepas de *S. sanguinis* expuestas a TPD (riboflavina al 0.5% y luz LED azul durante 40 segundos)

4 DISCUSIÓN

Este estudio tuvo como finalidad evaluar el efecto inhibitorio de la terapia fotodinámica sobre cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* (ATCC®25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC®10556) en presencia y ausencia de riboflavina al 0.5%. Se observó disminución en la viabilidad bacteriana de las cepas de *S. mutans* y *S. sanguinis* en presencia de riboflavina, evidenciando que la luz LED azul no juega un papel importante en la inhibición de la viabilidad bacteriana.

Con respecto a la metodología, en el presente estudio se utilizó la técnica de suspensión directa, tomando como unidad de medida el conteo de UFC.⁽⁶⁾ Esta técnica es ampliamente utilizada en microbiología, permitiendo realizar investigaciones en bacterias de la cavidad oral.^(2,15,16) Para lo cual, se utilizaron placas de agar con cultivos de las cepas bacterianas *S. mutans* y *S. sanguinis* sometidas a diferentes tratamientos.⁽⁶⁾

Numerosas investigaciones han evaluado el efecto de la terapia fotodinámica con luz azul y/o la riboflavina frente a diversas bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, entre otros.^(6-23,28-30) Sin embargo, no existe evidencia de estudios que utilicen lámpara de fotocurado dental de luz LED azul como inhibidor de cepas de *S. mutans* y de *S. sanguinis* en combinación con una vitamina del complejo B, como es la riboflavina. Ambos patógenos, son los microorganismos más comunes en la cavidad oral además de su participación en la aparición de caries dental y enfermedad periodontal.^(4,5)

Makdoui K. et al. afirman que la luz azul ($\lambda=402\text{nm} - 420\text{nm}$) puede eliminar bacterias Gram positivas y Gram negativas sin presencia de cromóforos.⁽²³⁾ La exposición de la luz sobre la riboflavina genera la excitación de la misma, liberando energía en forma de electrones, los cuales se transfieren a las moléculas de oxígeno formando especies reactivas de oxígeno (ROS). Al aumentar los niveles de ROS, se provocan daños a nivel de las proteínas y lípidos de la bacteria, afectando finalmente el ADN bacteriano.^(5-9,22,23) Finalmente, todo este conjunto de señalizaciones producen apoptosis o muerte celular programada de la bacteria.^(5-9,22,23)

En el presente estudio se observó que la riboflavina en presencia de luz azul tiene un mayor efecto inhibitorio sobre cepas de *S. sanguinis* que sobre las cepas de *S. mutans*. Este resultado

difiere a lo encontrado por Kang et al., quienes confirmaron que *S. mutans* frente a una luz LED azul-violeta (405nm) no es susceptible a la riboflavina. Asimismo, mostraron la susceptibilidad de *S. mutans* a la curcumina en bajas concentraciones y la protoporfirina IX.^(39,40) De la misma manera, Metcalf et al. reportaron que a una exposición de 500-550 nm se observa inhibición de *S. mutans* utilizando como fotosensibilizante a la eritrosina.⁽⁴¹⁾ En estudios sobre TPD realizados a *S. mutans* y *S. sanguinis*, Soria-Lozano et al. encontraron que ambas mostraron un efecto inhibitorio similar cuando se utilizó como fotosensibilizantes al azul de metileno y rosa de bengala.⁽⁴²⁾ También, Carrera et al. confirmaron que se podría incrementar el efecto inhibitorio en *S. mutans* implementando el fotosensibilizante activo de membrana celular (TBO) en la TPD.⁽⁴³⁾

Pese a que *S. mutans* y *S. sanguinis* son bacterias Gram positivas, que permiten el ingreso del fotosensibilizante a la membrana citoplasmática, por poseer una estructura porosa compuesta por peptidoglucanos y ácido lipoteicoico⁽⁴⁴⁾, se presentan distintas reacciones al mismo tratamiento que pueden deberse a diversos factores.⁽⁴⁵⁻⁵¹⁾ Algunos estudios sugieren que estas reacciones depende del tipo y concentración del fotosensibilizante junto con una longitud de onda ideal para que las bacterias de la cavidad oral reaccionen de forma diferente.^(45,46,47) Por otro lado, se sugiere que la efectividad de la TPD está condicionada a la carga eléctrica del fotosensibilizante y su capacidad de atraer o repeler agua.⁽⁴⁸⁾ Otros estudios han demostrado que los fotosensibilizadores catiónicos hidrófilos mejoran la respuesta de la TPD debido a su solubilidad y su fuerte atracción a la membrana celular cargada negativamente a diferencia de las molécula hidrofóbicas que son propensas a la agregación en medios físicos perturbando la unión a la membrana y evitando la formación de ROS.^(49,50,51) Sin embargo, en el presente estudio, a pesar que la riboflavina es una molécula hidrofílica muestra menor inhibición bacteriana sobre cepas de *S. mutans*. La razón de este resultado puede deberse a la gran capacidad de *S. mutans* para la producción de polisacáridos a partir de la sacarosa, lo que podría retrasar la difusión del fotosensibilizante generando reacciones diferentes a *S. sanguinis*.⁽⁴⁶⁾

Además se determinó que la fotoactivación con luz LED azul por si sola no inhibe la viabilidad bacteriana de *S. mutans* y *S. sanguinis*. Este resultado es similar a lo encontrado por Shiotusu-Ogura et al. quien al realizar fotoactivación con luz LED azul sobre *S. mutans* no evidenció diferencias significativas.⁽⁵²⁾ Asimismo, Kang et al. revelaron que tampoco observaron resultados relevantes luego de la exposición de luz LED azul frente a las cepas

de *S. mutans* en presencia de riboflavina.⁽³⁹⁾ No obstante, Ribeiro et al. demostraron que al añadir la resonancia de plasmones de superficie localizada (LSPR) de nanopartículas de oro, sí habrían mejoras en la TPD con riboflavina logrando el 99.2% de inhibición bacteriana.⁽⁵³⁾ De la misma forma, variando el ambiente (biofilm) y el tipo de luz (azul-ultravioleta) también se mostraron resultados de inhibición bacteriana en *S. mutans*.^(54,55) Por otro lado, Palma et al. y Pereira et al. trabajaron con cepas de *S. sanguinis* observando que no se encontraron diferencias significativas a la fotoactivación con luz LED azul.^(56,57) Lo mismo fue encontrado por Dovigo et al. y Peloj et al. quienes tampoco obtuvieron diferencias significativas frente al uso de luz LED azul como única variable. Sin embargo, sí se observaron resultados significativos en la TPD en presencia de riboflavina.^(58,59)

Este estudio muestra que la riboflavina no depende de la exposición a luz LED azul para ejercer su papel inhibidor. Sin embargo, Bohles et al. demostraron que al exponer durante 2 horas de luz solar intensa a la riboflavina diluida en leche se observó que el fotosensibilizante se destruyó en un 50%.⁽⁶⁰⁾ Asimismo, Combs et al. argumentaron que la intensidad de la destrucción depende del tiempo de exposición ya que al exponer por un periodo corto un pedazo de carne, se percibió que la riboflavina se había destruido en un 10-15%.⁽⁶¹⁾ Esta pérdida de riboflavina se debe a la degradación de la cadena lateral del ribitilo, la cual deja como productos de descomposición a la lumiflavina y el lumicromo.⁽⁶⁰⁾ Para trabajar con este fotosensibilizante, se recomienda implementar la luz roja en ambientes oscuros.⁽⁶¹⁾ Es por ello que al trabajar con la luz LED azul en un ambiente iluminado, no se registraron mejoras en la acción inhibitoria de la TPD puesto que la riboflavina no pudo cumplir su papel catalizador por ser sensible a la longitud de onda trabajada en la presente investigación.

Entre las limitaciones cabe resaltar que no se evaluó el efecto citotóxico de la riboflavina sobre líneas celulares de mamíferos mediante el método *in vitro* MTT (metil-tiazol-tetrazolio) para medir la actividad mitocondrial de la célula y predecir si se producirá cambios en la morfología celular. Tras la realización del presente estudio, se concluye que la riboflavina tiene un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las cepas bacterianas de *S. mutans* y *S. sanguinis*, y que la luz LED azul no tuvo efecto alguno sobre ambas cepas.

5 CONCLUSIÓN

Los microorganismos de la flora bacteriana de la cavidad oral pueden generar enfermedades cuando el medio se encuentra desequilibrado. Por ello, los especialistas se centran en la búsqueda de tratamientos mínimamente invasivos para prevenir o tratar las enfermedades que afectan a los tejidos dentarios y periapicales. Con esta finalidad, en el presente estudio se evaluó el efecto inhibitorio de la terapia fotodinámica sobre cepas de *S. mutans* y *S. sanguinis* en presencia y ausencia de riboflavina al 0.5%. Se concluyó que la luz LED azul no tiene un efecto inhibitorio sobre *S. mutans* y *S. sanguinis*. Sin embargo, al utilizar la luz LED azul en combinación con la riboflavina se observó una disminución significativa de la viabilidad bacteriana.

6 REFERENCIAS

- 1 Selwitz R, Ismail A, Pitts N. Dental caries. *Lancet* [Internet]. 2007 [citado 8 Feb 2020]; 369(9555): 51-9.
- 2 Ding Y, Wang W, Fan M, Tong Z, Kuang R, Jiang W. Antimicrobial and anti-biofilm effect of Bac8c on major bacteria associated with dental caries and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides* [Internet]. 2014 [citado 15 Sept 2019]; 52: 61-7.
- 3 Marsh P. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* [Internet]. 2006 [citado 15 Sept 2019]; 6(1): 14.
- 4 Ge Y, Caufield P, Fisch G, Li Y. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlates with caries experience in children. *Caries Res* [Internet]. 2008 [citado 15 Sept 2019]; 42: 444-448.
- 5 Fawzya A, Nitisusantab L, Iqbal K, Daooda U, Neo J. Riboflavin as a dentin crosslinking agent: ultraviolet a versus blue lighth. *Dent Mater* [Internet]. 2012 [citado 15 Sept 2019]; 28: 1284-1291.
- 6 Abana M, et al. Characterization of blue light irradiation effects on pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli*. *Microbiologyopen* [Internet]. 2017 [citado 15 Sept 2019]; 6(4).
- 7 Maclean M, Murdoch L, MacGregor S, Anderson J. Sporicidal Effects of High-Intensity 405 nm Visible Light on Endospore-Forming Bacteria. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2012 [citado 15 Sept 2019]; 89(1): 120–126.

- 8 Maclean M, Anderson J, MacGregor S, White T, Atreya C. A New Proof of Concept in Bacterial Reduction: Antimicrobial Action of Violet-Blue Light (405 nm) in Ex Vivo Stored Plasma. *J Blood Transfus* [Internet]. 2016 [citado 16 Sept 2019]; 1–11.
- 9 Biener G, et al. Blue/violet laser inactivates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by altering its transmembrane potential. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. 2017 [citado 16 Sept 2019]; 170: 118–124.
- 10 McKenzie K, Maclean M, Timoshkin I, MacGregor S, Anderson J. Enhanced inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by exposure to 405nm light under sub-lethal temperature, salt and acid stress conditions. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2014 [citado 16 Sept 2019]; 170: 91–98.
- 11 Bumah V, Whelan H, Masson-Meyers D, Quirk B, Buchmann E, Enwemeka C. The bactericidal effect of 470-nm light and hyperbaric oxygen on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Lasers Med Sci* [Internet]. 2015 [citado 20 Sept 2019]; 30(3): 1153–1159.
- 12 Fontana C, Song X, Polymeri A, Goodson J, Wang X, Soukos N. The effect of blue light on periodontal biofilm growth in vitro. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2015 [citado 20 Sept 2019]; 30(8): 2077–2086.
- 13 Wang Y, Wang Y, Wang Y, Murray C, Hamblin M, Hooper D, et al. Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2017 [citado 20 Sept 2019]; 33-35: 1-22.
- 14 Gupta S, Maclean M, Anderson J, MacGregor S, Meek R, Grant M. Inactivation of micro-organisms isolated from infected lower limb arthroplasties using high-intensity narrow-spectrum (HINS) light. *Bone Joint J* [Internet]. 2015 [citado 20 Sept 2019]; 97(2): 283-288.

- 15 Yoshida A, Sasaki H, Toyama T, Araki M, Fujioka J, Tsukiyama K, et al. Antimicrobial effect of blue light using *Porphyromonas gingivalis* pigment. *Sci Rep* [Internet]. 2017 [citado 25 Sept 2019]; 7(1): 5225.
- 16 Cohen-Berneron J, Steinberg D, Featherstone J, Feuerstein O. Sustained effects of blue light on *Streptococcus mutans* in regrown biofilm. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2016 [citado 25 Sept 2019]; 31(3): 445–452.
- 17 Chebath-Taub D, Steinberg D, Featherstone J, Feuerstein O. Influence of blue light on *Streptococcus mutans* re-organization in biofilm. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. 2012 [citado 27 Sept 2019]; 116: 75–78.
- 18 Hope C, Strother M, Creber H, Higham S. Lethal photosensitisation of *Prevotella ccae* under anaerobic conditions by their endogenous porphyrins. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2016 [citado 27 Sept 2019]; 13: 344–346.
- 19 Decarli M, Corrêa T, Vollet-Filho J, Bagnato V, Souza C. The influence of experimental conditions on the final result of photoinhibition of *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2017 [citado 27 Sept 2019]; 19: 229–234.
- 20 Amin R, Bhayana B, Hamblin M, Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* by photo-excitation of endogenous porphyrins: In vitro and in vivo studies. *Lasers Surg Med* [Internet]. 2016 [citado 27 Sept 2019]; 48(5): 562–568.
- 21 Bouillaguet S, Owen B, Wataha J, Campo M, Lange N, Schrenzel J. Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. *Dent Mater* [Internet]. 2008 [citado 27 Sept 2019]; 24(8): 1070–1076.

- 22 Makdoui K, Goodrich R, Bäckman A. Photochemical eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by blue light activation of riboflavin. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2017 [citado 27 Sept 2019]; 95(5): 498–502.
- 23 Makdoui K, Hedin M, Bäckman, A. Different photodynamic effects of blue light with and without riboflavin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and human keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2019 [citado 27 Sept 2019]; 34(9): 1799 – 1805.
- 24 Manchón F, Delgado-Iribarren A, Fuentes A, Garcia I, Sierra M. Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC [Internet]. 2000 [citado 29 Sept 2019]; 1:1-26. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia4a.pdf>
- 25 Lange N. Handbook of biomedical fluorescence. 1ra ed. Nueva York: CRC Press; 2003.
- 26 Campo MA, Gabriel D, Pavel Kucera P, Robert Gurny R, Lange N. Polymeric photosensitizer prodrugs for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2007 [citado 28 Oct 2019]; 83:1–8.
- 27 Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* and dental caries. *Rev. CES Odonto* [Internet]. 2013 [citado 28 Oct 2019]; 26(1) 44-56.
- 28 Bischoff-Ferrari H, Dawson-Hughes B, Orav E, Staehelin H, Meyer O, Theiler R, et al. Monthly high-dose vitamin D treatment for the prevention of functional decline: A randomized clinical trial. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2016 [citado 28 Oct 2019]; 176(2):175–183.

- 29 Cummings S, Kiel D, Black D. Vitamin D supplementation and increased risk of falling: A cautionary tale of vitamin supplements retold. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2016 [citado 28 Oct 2019]; 176(2):171–172.
- 30 Uusi-Rasi K, Patil R, Karinkanta S, Kannus P, Tokola K, Lamberg-Allardt C, et al. Exercise and vitamin D in fall prevention among older women: A randomized clinical trial. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2015 [citado 28 Oct 2019]; 75(5):703–711.
- 31 Opal S, Garg S, Jain J, Walia I. Genetic factors affecting dental caries risk. *Aust Dent J* [Internet]. 2015 [citado 28 Oct 2019]; 60(1):2–11.
- 32 Calache H, Christian B, Mamerto M, Kangukar T, Hall M. An epidemiological study of dental caries and associated risk factors among primary school children in the Aileu Municipality, Timor-Leste. *Rural and Remote Health* [Internet] 2019 [citado 28 Oct 2019]; 19:5322.
- 33 Hidalgo I, Duque de Estrada J, Pérez JA. La caries dental: Algunos de los factores relacionados con su formación en niños. *Rev Cubana Estomatol* [Internet]. 2008 [citado 28 Oct 2019]; 45(1).
- 34 Hariyani N, Soebekti RH, Setyowati D, Bramantoro T, Palupi LS, Oktarina, O, et al. Factors influencing the severity of dental caries among Indonesian children with autism spectrum disorder – a pilot study. *Clin Cosmet Investig Dent* [Internet]. 2019 [citado 28 Oct 2019]; 11:227-233.
- 35 Hyo-Jin L, Dilip P, Bo-Hyoung J. Dental caries status and related modifiable factors among Nepali students. *Community Dent Health*. [Internet]. 2019 [citado 28 Oct 2019]; 36(3):207-213.
- 36 Bowen WH. Dental caries - not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol* [Internet]. 2015 [citado 28 Oct 2019]; 31(3):228-233.

- 37 Roll EB, Dahl JE, Runnigen G, Morisbak E. In vitro cell death induced by irradiation and chemicals relevant for dental applications; dose-response and potentiation effects. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 2004 [citado 29 Oct 2019]; 112(3):273-279.
- 38 Asnaashari M, Mojahedi SM, Asadi Z, Azari-Marhabi S, Maleki A. A comparison of the antibacterial activity of the two methods of photodynamic therapy (using diode laser 810 nm and LED lamp 630 nm) against *Enterococcus faecalis* in extracted human anterior teeth. *Photodiagn Photodyn* [Internet]. 2016 [citado 31 Oct 2019]; 13:233-237.
- 39 Kang SM, Jung HI, Kim BI. Susceptibility of oral bacteria to antibacterial photodynamic therapy. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2019 [citado 31 Oct 2019]; 11(1):1-8.
- 40 Lee HJ, Kang SM, Jeong SH, Chung KH, Kim BI. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and *Curcuma xanthorrhiza* extract against *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2017 [citado 31 Oct 2019]; 20:116-119.
- 41 Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2006 [citado 31 Oct 2019]; 58(1):190-192.
- 42 Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiol* [Internet]. 2015 [citado 10 Nov 2019]; 15:1-8.
- 43 Carrera ET, Dias HB, Corbi SC, Marcantonio AC, Bagnato VS, Hamblin MR, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in

- dentistry: a critical review. *Laser Phys* [Internet]. 2016 [citado 10 Nov 2019]; 26(12):2-11.
- 44 Hakimiha N, Khoei F, Bahador A, Fekrazad R. The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2014 [citado 10 Nov 2019]; 22(2):80-84.
- 45 Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2003 [citado 10 Nov 2019]; 18(1):51-55.
- 46 Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med* [Internet]. 2003 [citado 10 Nov 2019]; 14(2):89-99.
- 47 Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Goncalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 2006 [citado 10 Nov 2019]; 114(1):64-69.
- 48 Zhang AN, Wu W, Zhang C, Wang QY, Zhuang ZN, Cheng H, et al. A versatile bacterial membrane-binding chimeric peptide with enhanced photodynamic antimicrobial activity. *J Mat Chem B* [Internet]. 2019 [citado 10 Nov 2019]; 7:1087–1095. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/tb/c8tb03094d#!divAbstract>
- 49 Akilov OE, Kosaka S, O’Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte TJ, et al. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against *Leishmania* parasites. *Chem Biol* [Internet]. 2006 [citado 10 Nov 2019]; 13(8):839-847.

- 50 Raschke TM, Tsai J, Levitt M. Quantification of the hydrophobic interaction by simulations of the aggregation of small hydrophobic solutes in water. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2001[citado 10 Nov 2019]; 98(11):5965-5969.
- 51 Li WT. Nanoparticles for photodynamic therapy. En: Popp J, Tuchin V, Chiou A, Heinemann S, editores. *Handbook of biophotonics*. Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013. p. 321-336.
- 52 Shiotusu-Ogura Y, Yoshida A, Kan P, Sasaki H, Toyama T, Izukuri K, et al. A consideration of antimicrobial photodynamic therapy using the plaque disclosing solution on *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis and Photodyn Ther* [Internet]. 2019 [citado 10 Nov 2019]; 26:252- 257.
- 53 Ribeiro MS, de Melo LS, Farooq S, Baptista A, Kato IT, Núñez SC, et al. Photodynamic inactivation assisted by localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles: In vitro evaluation on *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis and Photodyn Ther* [Internet]. 2018 [citado 12 Nov 2019]; 22:191-196.
- 54 Gomez GF, Huang R, Eckert G, Gregory RL. Effect of phototherapy on the metabolism of *Streptococcus mutans* biofilm based on a colorimetric tetrazolium assay. *J Oral Sci* [Internet]. 2018 [citado 12 Nov 2019]; 60(2):242-246.
- 55 Gomez G, Huang R, MacPherson M, Ferreira Zandona AG, Gregory RL. Photo Inactivation of *Streptococcus mutans* Biofilm by Violet-Blue light. *Curr Microbiol* [Internet]. 2016 [citado 12 Nov 2019]; 73(3):426-433.
- 56 Palma A, Ramos L, Domingues N, Back-Brito G, de Oliveira LD, Pereira C. Biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus sanguinis* and their Susceptibility to Antimicrobial Effects of Photodynamic inactivation. *Photodiagnosis and Photodyn Ther* [Internet]. 2018 [citado 12 Nov 2019]; 24:95-101.

- 57 Pereira C, Costa A, Carreira C, Junqueira J, Jorge A. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2012 [citado 12 Nov 2019]; 28(3):859-864.
- 58 Dovigo L, Pavarina A, Mima E., Giampaolo E., Vergani C., Bagnato V. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* [Internet]. 2011 [citado 12 Nov 2019]; 54(2):123-130.
- 59 Peloi L, Soares R, Biondo C, Souza V, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light emitting-diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci* [Internet]. 2008 [citado 12 Nov 2019]; 33(2):231-237.
- 60 Bohles H. Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *Int J Vitam Nutr Res* [Internet]. 1997 [citado 12 Nov 2019]; 67(5):321-328.
- 61 Combs GF, McClung JP. Riboflavin. *The Vitamins*. Vol 5. Massachusetts: Academic Press; 2017.

