



Efecto antimicrobiano de la terapia con ozono contra *Streptococcus sanguis* como tratamiento preventivo de enfermedad periodontal: estudio *in vitro*

Ricardo Peralta Estrada,* Francisco Javier Vázquez González,** Javier Portilla Robertson,***
Nayeli Carrasco Mendoza,**** Alejandro Donohué Comejo,***** Juan Carlos Cuevas González,*****
Karla Tovar Carrillo,***** León Francisco Espinosa Cristóbal,***** Manuel Alejandro Arroyo Meneses*****

RESUMEN

La enfermedad periodontal es una de las enfermedades orales más prevalentes en el mundo con una etiología bacteriana. *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*) es un microorganismo estrechamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad periodontal. A pesar de las terapéuticas actuales, es necesario evaluar otros agentes antimicrobianos para el tratamiento de la enfermedad periodontal. El objetivo de este estudio fue evaluar las variaciones en la administración del ozono y la relación con su efecto antimicrobiano en la inhibición de *Streptococcus sanguis*. Diversos tubos con medio de cultivo de infusión cerebro-corazón fueron expuestos a ozono gaseoso para obtener ozono acuoso en diversas concentraciones (0.0042-0.0493 mg/mL) y tiempos de exposición (10-900 s) con diferentes accesorios para la administración de ozono (aguja convencional y modificada, respectivamente). La evaluación antimicrobiana se realizó a través de pruebas microbiológicas de extendido bacteriano en placas de agar sangre. Los resultados indicaron que el ozono acuoso obtenido a través de una aguja modificada inhibió significativamente el crecimiento de *S. sanguis* con bajas concentraciones y tiempos de exposición cortos en comparación con la técnica de ozonización convencional, lo que reveló un efecto dependiente de la dosis y del tiempo. La terapia con ozono podría usarse como agente antimicrobiano alternativo para el control del crecimiento de la bacteria *S. sanguis*.

Palabras clave: Terapia con ozono, *Streptococcus sanguis*, efecto antimicrobiano, enfermedad periodontal.

ABSTRACT

The periodontal disease is one of the most prevalent oral diseases in worldwide that includes a bacterial etiology. The *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*) is a microorganism that has been strongly associated with the development of periodontal disease. Notwithstanding that there are acceptable treatments, it is necessary to evaluate alternative antimicrobial agents for the treatment of periodontal disease. The objective of this study was to evaluate variations of the ozone administration and its antimicrobial effect against *S. sanguis*. Tubes with brain-heart infusion broth were exposed to gaseous ozone to obtain aqueous ozone in several concentrations (0.0042-0.0493 mg/mL) in different times (10-900 s) using various accessories for ozone administration (conventional and modified needle respectively). Antimicrobial assay was made using spread microbiologic tests with blood agar plates. Results indicated that aqueous ozone with modified needle inhibited more significantly the *S. sanguis* growth using low concentrations and shorter times of exposition compared to conventional ozonized technique, indicating a mechanism dose-time dependent. The ozone therapy could be used as an alternative antimicrobial agent for bacterial growth inhibition of *S. sanguis*.

Key words: Ozone therapy, *Streptococcus sanguis*, antimicrobial effect, periodontal disease.

* Profesor Investigador de la Especialidad de Periodoncia, Departamento de Estomatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

** Profesor Investigador Bacteriología: Diagnóstico; Aplicación en la salud y en el campo: daño o beneficio. Del programa de Biología. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

*** Profesor Investigador en Materia de Patología Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México.

**** Alumna de la Especialidad de Ortodoncia, Departamento de Estomatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

***** Profesor Investigador de la Maestría en Ciencias Odontológicas, Departamento de Estomatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

***** Alumno de la Especialidad de Periodoncia, Departamento de Estomatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una patología multifactorial que afecta las estructuras de soporte del diente. Representa un problema de salud pública en el mundo debido a la pérdida de los tejidos del soporte del diente por la presencia y patogenicidad de agentes microbianos.¹ El desarrollo de la enfermedad periodontal es difícil de descifrar por la complejidad de los microorganismos que la desencadenan. Aunque existe gran variedad de microorganismos asociados a esta enfermedad, se considera a *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*) como uno de los microorganismos potencialmente promotores de la enfermedad periodontal.¹ *S. sanguis* que pertenece al grupo de *Streptococcus viridans*,² se le asocia estrechamente a enfermedades cardíacas y se le relaciona con el desarrollo de bacteriemias, adenocarcinomas y otras complicaciones después de cirugías de corazón en seres humanos al llegar a las válvulas cardíacas anormales, lo que representa una de las principales causas de endocarditis bacteriana.³⁻⁷ *S. Sanguis* es una especie que actúa en la colonización secundaria por competición, principalmente con *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y ocasiona una importante patogenicidad en comparación con el resto de las bacterias periodontales presentes.^{8,9} Se ha reportado que interacciones interespecies específicas altamente complejas pueden tener una parte esencial en el balance de comunidades microbianas con múltiples especies. Además, evaluaciones *in vitro* de *S. sanguis* que interactúan con *S. mutans* han demostrado una coexistencia regulada a través de factores como las bacteriocinas (producidas por *S. mutans*) y peróxido de hidrógeno (producido por *S. sanguis*) principalmente.

Con frecuencia se le ubica en la placa dentobacteriana subgingival de pacientes con periodontitis y su existencia se le asocia a un retraso en la colonización de periodontopatógenos.¹⁰ En pequeñas concentraciones no es dañino, pero una vez que extiende sus colonias puede llegar a representar un problema sanitario bastante serio al grado de poner en riesgo la salud sistémica de los pacientes. Se han diseñado diversas terapias para el control y prevención de la colonización de microorganismos que se asocian a la enfermedad periodontal;¹¹⁻¹³ sin embargo, la frecuencia y prevalencia de las enfermedades periodontales, primordialmente periodontitis, siguen siendo un serio problema de salud en todo el mundo.^{14,15} Uno de los principales enfoques en la evaluación de nuevos sis-

temas terapéuticos que logran prevenir y controlar la colonización de los microorganismos más importantes asociados a la enfermedad periodontal es a través de la generación de un apropiado efecto antimicrobiano que actúe inhibiendo el crecimiento bacteriano específico. Una alternativa es la terapia con ozono, la cual ha sido previamente evaluada por otros estudios que le atribuyen amplias aplicaciones biomédicas para el control de microorganismos.¹⁶⁻¹⁹ El ozono es un gas que actualmente se prefiere utilizar cada vez más tanto en la industria como en el campo de la medicina, incluso en el campo odontológico ha tenido múltiples usos gracias a su actividad bactericida, fungicida y virucida relacionada con la alta actividad de las moléculas de oxígeno que generan un efecto altamente biooxidativo a nivel de las células bacterianas principalmente.²⁰⁻²² En la actualidad se considera que el ozono produce alteraciones en la membrana por ozonólisis de los ácidos grasos insaturados de la pared bacteriana y que actúa como bactericida, virucida, microbicida, parasitocida y fungicida.^{22,23} Pese a que diversos estudios han corroborado la acción oxidante del ozono y su excelente efecto antimicrobiano en diversos tipos de microorganismos en terapias biomédicas potenciales,^{18,19,24,25} hoy en día la literatura científica no aporta suficientes elementos que evalúen el efecto antimicrobiano con la terapia de ozono en la bacteria de *S. sanguis*. Esta evaluación ayudará a mejorar de manera significativa las terapias periodontales para el control y/o prevención de la enfermedad periodontal. En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano de la terapia con ozono en diversas concentraciones en la bacteria de *S. sanguis* y determinar la concentración mínima de ozono capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de forma *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los medios con ozono

Se ozonificaron diversos tubos que contenían un volumen de 1 mL de caldo de cultivo infusión cerebro-corazón (BHI, Bioxon) a través de la inmersión de una aguja perteneciente a un generador de ozono (Odontozono Carbar's, BRJ OZONO S.A. de C.V. modelo 03AOD), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante que incluían la posición en la colocación del instrumento, el tiempo de exposición, el flujo de aire y aguja recta con diámetro estrecho. Los tiempos de

exposición según el fabricante fueron desde 10 hasta 900 s. Adicionalmente se generó una modificación en la técnica recomendada por el fabricante, la cual cambió los tiempos de exposición y las características de la aguja punta curva y mayor diámetro (inició en 0.8 mm recta, cambió a 2.1 mm con ventana lateral). Los tiempos para esta modificación fueron desde 90 hasta 350 s. Para ambas técnicas, cada tipo de aguja fue introducida en cada uno de los tubos y en ese mismo momento se inició el conteo para la determinación del tiempo de exposición de cada uno de los tubos que contenían el caldo BHI. Estos parámetros se repitieron sistemáticamente en cada uno de los tubos de ambas técnicas. Todos los experimentos se realizaron en condiciones de esterilidad con el uso de una campana de flujo laminar (All America modelo No.25X) y materiales previamente esterilizados con autoclave. De esta manera se obtuvieron tubos con BHI expuestos a ozono en tiempos que fueron de 90 a 900 s con variación en el tipo de aguja utilizada.

Prueba antimicrobiana

La bacteria que se usó en este estudio fue una cepa de referencia *S. sanguis* CFQ-B-225 (*World Federation Culture Collections*), la cual fue proporcionada por la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se depositaron 10 µL de una suspensión estandarizada de *S. sanguis* en cada uno de los tubos de BHI expuestos al ozono en diferentes tiempos respectivamente. Cada tubo se agitó por 5 s para lograr la correcta dispersión de las bacterias en el medio de cultivo ozonificado y finalmente se incubaron a una temperatura de 37 °C por 24 horas. Al cabo de este tiempo, 1 µL de cada suspensión de caldo BHI ozonificado con bacterias se depositó en placas de agar sangre efectuando un extendido de la suspensión en toda el área de la placa. Una vez obtenido el cultivo las placas se volvieron a incubar a 37 °C por 24 horas. Se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) mediante el uso de un contador de colonias (Leica Quebec Darkfield). Cada procedimiento se realizó por triplicado.

Análisis estadísticos

Los resultados de la actividad antimicrobiana se reportaron en promedios, desviación estándar y desviación estándar relativa. La diferencia entre grupos se obtuvo por la prueba estadística de correlación a

través del software SPSS 20. Las diferencias estadísticas se determinaron cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

En el *cuadro I* se describen los resultados de las inhibiciones de crecimiento de *S. sanguis* con las distintas técnicas utilizadas con ozono. La técnica con la aguja modificada produjo mejores resultados en la actividad antimicrobiana de *S. sanguis* en comparación con la técnica convencional. En los tiempos iniciales (90 y 100 s) la técnica con aguja modificada mostró menor cantidad de UFC de *S. sanguis* (912×106 UCF) comparada con la técnica convencional (1980×106 UCF); no obstante, la inhibición total de colonias de *S. sanguis* se observó en la técnica con aguja modificada en un tiempo mucho menor (335 s) que la técnica convencional (700 s), lo cual corresponde a 52% en la reducción en los tiempos de exposición en la técnica con aguja modificada. Lo anterior demuestra que la técnica con aguja modificada con un tiempo relativamente más bajo comparada con la técnica convencional produce un efecto inhibitorio de *S. sanguis* mucho mejor, aun si el tiempo de ozonificación es reducido.

El *cuadro II* describe las dosis letales para la terapia con aguja modificada. Los valores de las unidades formadoras de colonias se observaron dependientes del tiempo de exposición y de la con-

Cuadro I. Técnicas de ozonización en la inhibición del *S. sanguis* de acuerdo al tiempo de ozonificación.

Aguja convencional		Aguja modificada	
Tiempo (s)	UFC	Tiempo (s)	UFC
100	1980000000	90	912000000
200	1170000000	200	1520000
300	840000	300	552333
400	15000	310	414000
500	310	320	310000
600	203	330	115333
700	0	335	0
800	0	340	0
900	0	350	0
Testigo +	2372000000		2628000000
Testigo -	0		0

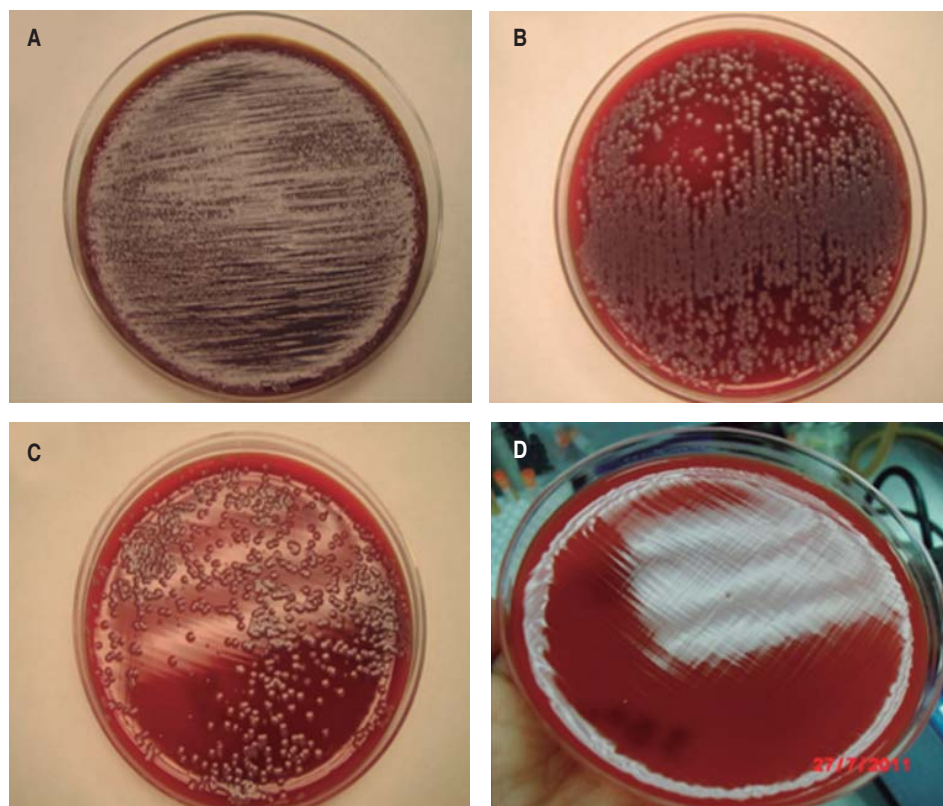
Cuadro II. Efecto antimicrobiano del ozono en *S. sanguis*.

Corrimiento	O ₃ (mg/mL)	Media (UFC)	Desviación estándar	RSD
Testigo –	0	0	0	0
Testigo +	0	2628000000	173112680.1	1518.08637
C 1	0.0042	2046666666	61101009.27	3349.64
C 2 DL50	0.0084	1280000000	62096698.79	2061.30
C 3	0.0126	912000000	8000000	11400
C 4	0.0169	358666666	28095076.67	1276.61
C 5 DL99	0.0183	11221333	692188.79	1621.13
C 6	0.0197	8866666	280950.76	3155.95
C 7	0.0211	7897333	422001.57	1871.39
C 8	0.0225	4498666	348375.27	1291.32
C 9	0.0239	2993333	230072.45	1301.03
C 10	0.0253	2232000	216443.98	1031.21
C 11	0.0282	1520000	42142.61	3606.80
C 12	0.0352	925333	226144.49	409.17
C 13	0.0423	552333	57011.69	968.80
C 14	0.0437	414000	31749.01	1303.97
C 15	0.0451	310000	30789.60	1006.83
C 16	0.0465	115333	25540.81	451.56
C 17 DL100	0.0472	0	0	0
C 18	0.0479	0	0	0
C 19	0.0493	0	0	0

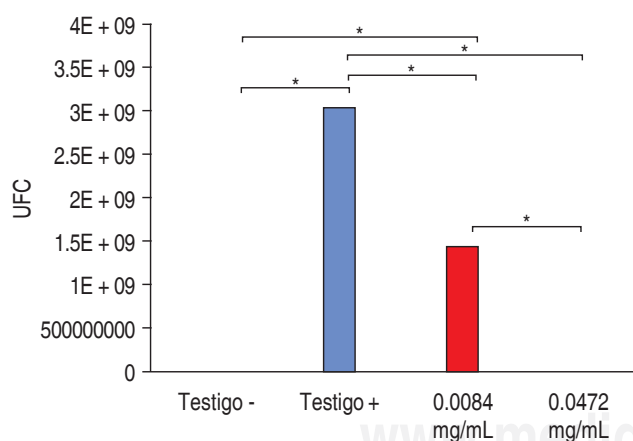
La concentración de ozono fue expresado en miligramos por mililitro (mg/mL). El número de unidades formadoras de colonias (UFC) fue expresado como promedio y desviación estándar. C = corrida; DL = dosis letal; RSD = desviación estándar relativa.

centración en la terapia modificada considerando una correlación que es dependiente de la dosis y del tiempo ($p < 0.05$). Las dosis letales de ozono detectadas fueron de 50, 99 y 100% de la inhibición bacteriana, las cuales representan dosis y tiempos relativamente estrechos entre 50 y 99% (0.0084 y 0.0183 mg/mL respectivamente). Aun cuando la inhibición bacteriana de 100% se observó a una dosis de ozono mucho mayor (0.0472 mg/mL), podría recomendarse una inhibición bacteriana satisfactoria cuando se usan concentraciones más bajas de ozono (0.0183 mg/mL). Lo anterior fue confirmado a través del cultivo bacteriano en agar sangre, en el que se demuestra el efecto antimicrobiano de la terapia con ozono en la inhibición del crecimiento de la bacteria de *S. sanguis* (Figura 1A). Las dosis más bajas de ozono (0.0084 y 0.0183 mg/mL) presentaron una inhibición bacteriana que se asoció a la dosis con menores efectos inhibitorios en concentraciones

bajas (1.28×10^9 UFC) comparadas con las concentraciones altas ($\sim 1.12 \times 10^7$ UFC) (Figura 1B y 1C). Por otro lado, la concentración más elevada utilizada en este estudio (0.0472 mg/mL) mostró una inhibición bacteriana de *S. sanguis* de 100% demostrando un efecto bactericida en comparación con las otras dosis de menor concentración de ozono (Figura 1D). Estadísticamente se observaron diversas diferencias al comparar las pruebas testigo (positivo y negativo) con las diferentes concentraciones de ozono (0.0084 y 0.0472 mg/mL) (Figuras 2 y 3). La concentración más baja de ozono (0.0084 mg/mL) evidenció mayor inhibición de crecimiento que el grupo testigo positivo (crecimiento bacteriano), aunque el grupo con una concentración más elevada de ozono (0.0472 mg/mL) mostró significativamente los mayores efectos inhibitorios de la bacteria *S. sanguis* en comparación con los grupos testigo y el grupo con una concentración baja de ozono (0.0084 mg/mL) ($p < 0.05$).

**Figura 1.**

UFC de *S. sanguis* A. Testigo positivo; B. Ozono 0.0084 mg/mL; C. Ozono 0.0183 mg/mL; D. Ozono 0.0472 mg/mL.

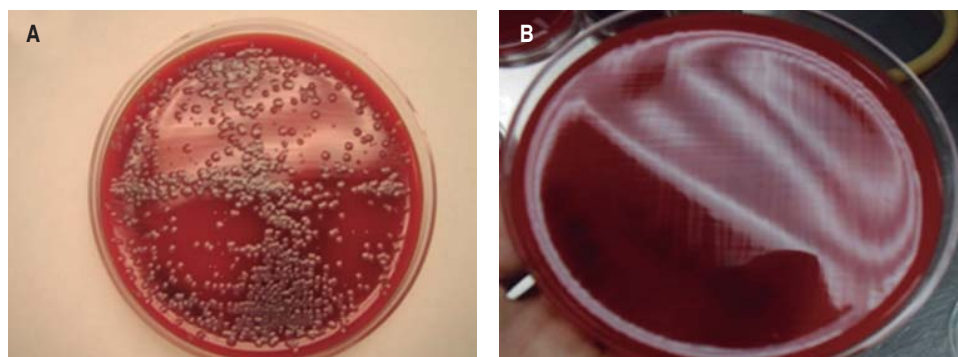
**Figura 2.** Diferencias significativas en el efecto inhibitorio del ozono en *S. sanguis*. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

El presente estudio reveló que la terapia con ozono tiene un efecto antimicrobiano en *S. sanguis* de forma *in vitro* y evidenció un efecto de inhibición

de crecimiento de *S. sanguis* que es dependiente de la concentración de ozono. Estos resultados ayudan en gran medida a entender mejor el efecto antimicrobiano que la terapia con ozono puede ofrecer en la inhibición de crecimiento de *S. sanguis* y sobre todo para el posible control en la formación de la placa dentobacteriana. La literatura científica ha demostrado que *S. sanguis* es uno de los principales agentes responsables de desencadenar diversas enfermedades bucodentales y sistémicas,⁵⁻⁷ pero también se le ha asociado en la formación inicial de la placa dentobacteriana, la cual es considerada el principal agente etiológico de las enfermedades orales más prevalentes en el mundo (caries y enfermedad periodontal).^{8,9} Actualmente diversos tratamientos han comprobado un control en la formación inicial de la placa dentobacteriana;²⁵⁻²⁷ no obstante, deberían investigarse a fondo otras terapéuticas alternativas como la terapia con ozono para indicarla como posible control en la inhibición de crecimiento de la placa dentobacteriana.

Un estudio en 2016 evaluó el efecto antimicrobiano de ozono gaseoso (140 ppm, 6-24 s) en las

**Figura 3.**

Inhibición de UFC de *S. sanguis* con ozono. **A.** Ozono 0.0084 mg/mL; **B.** Ozono 0.0472 mg/mL.

bacterias de *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) y *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) adheridas a superficies de titanio y zirconia para la prevención de infecciones periimplantarias. Los resultados revelaron que la bacteria *S. sanguinis* fue más resistente al ozono gaseoso (140 ppm, 24 s) comparada con la bacteria *P. gingivalis* en una superficie específica, aunque de forma general el ozono gaseoso disminuyó significativamente la adherencia de ambos microorganismos en las superficies de titanio y zirconia.²⁸ En nuestro estudio usamos concentraciones mucho más bajas (0.0084 y 0.0473 ppm) para lograr la inhibición total de la bacteria de *S. sanguis* pero sin la evaluación de la adherencia en ningún sustrato en especial, lo que sugiere que el efecto inhibitorio del ozono puede depender también de las características topográficas de una determinada superficie. Un estudio en 2008 evaluó la efectividad del ozono saturado en agua contra diversos microorganismos presentes en cepillos dentales (incluyendo *S. sanguis*) usados de uno a tres meses en niños y adultos. La actividad antimicrobiana del ozono (3-3.5 ppm) fue determinada parcialmente en ciertos periodos graduales de exposición (5, 10, 15 y 20 min) en la mayoría de las bacterias, aun así se logró una inhibición completa de todos los microorganismos cuando el tiempo de exposición fue mucho más prologado (30 min).²⁹ Nuestros resultados únicamente evaluaron *S. sanguis* fuera de una biopelícula con otros microorganismos; sin embargo, los mejores efectos inhibitorios del ozono alcanzados en nuestro estudio respecto al tiempo de exposición fueron mucho más bajos (1-5.4 min) que aquéllos reportados previamente;²⁹ lo cual sugiere que el tiempo de exposición podría participar de forma determinante en la actividad antimicrobiana del ozono contra *S. sanguis*. Otro estudio en 2000

comparó la eficiencia de desinfección de diversos métodos, incluyendo el ozono, en la inhibición bacteriana de *S. sanguis*, *S. epidermidis* y *B. subtilis* en materiales de impresión y modelos de yesos. Los resultados revelaron que todos los métodos de desinfección inhibieron el crecimiento bacteriano de *S. sanguis* y *S. epidermidis*, aun cuando el tratamiento con ozono evidenció menor actividad de inhibición de crecimiento del microorganismo *B. subtilis* en comparación con el resto de los métodos de desinfección. Algunos autores recomiendan el tratamiento con ozono para la desinfección de modelos de yesos.³⁰ Nuestros resultados arrojaron datos relativamente por debajo de los reportados previamente en los que una concentración de 0.0084 mg/mL (0.0084 ppm) y 0.0473 mg/mL (0.0473 ppm) que utilizaron tiempos de 60 y 335 s (1-5.4 min) respectivamente mostraron una inhibición de crecimiento bacteriano de *S. sanguis* de 50 y 100%. Las variaciones reportadas podrían estar relacionadas principalmente con las características físicas y químicas del medio donde se evalúa la bacteria de *S. sanguis* (metales, cerámicas, yesos, etc.),^{31,32} forma de administración del ozono (acuosa o gaseosa), el equipo y fabricante del generador de ozono, accesorios para el mejoramiento de la ozonización acuosa, medios de cultivo, técnicas microbiológicas empleadas y posiblemente hasta el tipo de materiales que se usan como reservorio del agua ozonizada. Además, las variaciones en la resistencia bacteriana de *S. sanguis* podrían estar relacionadas con la habilidad natural propia de la bacteria para competir por la colonización inicial, manteniendo un metabolismo más resistente a agentes antimicrobianos.²⁸

Por otra parte, diversas bacterias orales y no orales relacionadas con infecciones serias han demostrado una sensibilidad antimicrobiana sig-

nificativa cuando son expuestas a terapias con ozono. Estudios han reportado un buen efecto antibacteriano de agua ozonizada en la inhibición de diversos microorganismos (*S. aureus*, *Candida*, *S. bovis*, *S. beta* hemolítico grupo B, *Staphylococcus coagulasa* negativo, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *S. viridans* y *Lactobacillus*), incluyendo periodontopatógenos (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) con tiempos de seis hasta 24 s y de cinco hasta 30 min en concentraciones relativamente altas (2.24 mg /mL y 0.6 mg/mL).^{16,33,34} El ozono ha evidenciado en bacterias especialmente periodontopatógenas una gran actividad bactericida contra diversos microorganismos, en particular *Porphyromonas gingivalis*, aun si dicho efecto fue nulo en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.³⁴ Estos resultados claramente sugieren que el efecto que ofrece el ozono tiene una posible actividad que afecta de manera selectiva las diferentes especies periodontopatógenas, aun cuando las diferencias pueden estar íntimamente relacionadas con el tipo de administración, dosis, tiempos de exposición, entre otros. Por parte del ozono las características microbiológicas particulares de cada especie periodontopatógenas seguramente podrían también estar estrechamente vinculadas a la actividad antimicrobiana de la terapia con ozono. Además, estudios recientes han evaluado la actividad antimicrobiana del ozono contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ozonizando diversos vehículos (propilenglicol, EDTA, NaOCl) a diferentes tiempos (desde uno o dos hasta 60 min) y concentraciones (desde 1.2 hasta 20 mg/mL) proponiendo el ozono gaseoso y acuoso como una terapéutica antimicrobiana con alto potencial de aplicación para el control de este microorganismo.^{18,19,24,35,36} Cabe destacar que algunos estudios también han evaluado el efecto antimicrobiano del ozono en bacterias resistentes a antibióticos (*E. coli*, *S. aureus* resistente a oxacilina, *S. aureus* susceptible a oxacilina, *E. faecalis* resistente a vancomicina, *Klebsiella pneumoniae* productor de beta lactamasa de espectro extendido, *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenem, *Acinetobacter baumannii* susceptible sólo a carbapenem y *P. aeruginosa* susceptible a imipenem y meropenem) con el uso de ozono gaseoso de 20 µg/mL por 5 min que inhibe por completo todas las bacterias potencialmente patógenas.³⁷ Aunque nuestro diseño usó un tipo de ozono acuoso administrado

al vehículo con una modificación en la aguja y el tipo de concentración empleada fue ligeramente menor en comparación con los estudios antes mencionados en la inhibición completa a la bacteria *S. sanguis*, diversos factores podrían desempeñar un papel decisivo en el efecto inhibitorio de la terapia con ozono como la presentación, administración, accesorios de ozonización y el equipo generador de ozono, así como propiedades microbiológicas de cada especie bacteriana (metabolismo, tipo de membrana, susceptibilidad y resistencia a antimicrobianos, patogenicidad, entre otros). Es bien sabido que el ozono posee una elevada solubilidad debido a su propiedad de dispersarse fácilmente en el agua, en particular cuando se usan altas concentraciones²⁹ generando una ruptura en las membranas celulares³⁸ al reaccionar con ácidos grasos insaturados de la membrana fosfolipídica produciendo una serie de peróxidos hidrofílicos y a su vez estimulando la formación de sustancias desoxigenantes que actúan en la oxihemoglobina, lo que conlleva a la liberación de oxígeno y con ello a un aumento suplementario en los tejidos^{22,23} causando una muerte celular bacteriana.

Aun cuando asumiéramos que una concentración aumentada de ozono y el tiempo prolongado de exposición a éste último podrían mejorar la terapéutica para el control y/o prevención de la enfermedad periodontal o de otras enfermedades bucales, debería evaluarse cuidadosamente el potencial toxicológico del ozono en los pacientes y en el aire que rodea el consultorio de acuerdo con los límites de seguridad recomendados por los fabricantes de cada equipo generador de ozono.³⁹ Pese a que se ha propuesto recientemente el ozono como terapéutica para el manejo de caries radicular de dientes temporales,^{40,41} se requieren estudios más amplios para determinar el uso seguro y correcto de la terapia con ozono para el posible control de la placa dentobacteriana en seres humanos.

CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró la actividad antimicrobiana que posee la terapia con ozono acuoso en la inhibición de la bacteria de *S. sanguis*, la cual comprobó ser dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. Por otra parte, el uso de accesorios especializados como la aguja con punta curva y de mayor diámetro ayudó a mejorar la ozonización del

vehículo (caldo de cultivo BHI) produciendo un incremento en la actividad inhibitoria del ozono contra la bacteria. La concentración y el tiempo de exposición del ozono utilizados en este estudio demostraron tener un efecto inhibitorio significativo en *S. sanguis*, incluso por debajo de los valores reportados. Aunque se requieren otros métodos de evaluación *in vitro* e *in vivo* para entender mejor la terapia con ozono, el potencial de aplicación en el área biomédica parece ser prometedor para el control de infecciones bucales causadas por microorganismos pertenecientes a biopelículas bacterianas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) por el financiamiento parcial de este estudio.

Lic. Carlos G-M Barajas Díaz Director General de Ozono Carbar's y al Lic. Mauricio Barajas Gerente de Marketing por el apoyo para el presente trabajo.

REFERENCIAS

- Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006; 6 (Suppl 1): S14.
- Alcaide F, Liñares J, Pallares R, Carratala J, Benitez MA, Gudiol F et al. *In vitro* activities of 22 beta-lactam antibiotics against penicillin-resistant and penicillin-susceptible viridans group streptococci isolated from blood. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39 (10): 2243-2247.
- Alcaide F, Carratala J, Liñares J, Gudiol F, Martin R. *In vitro* activities of eight macrolide antibiotics and RP-59500 (quinupristin-dalfopristin) against viridans group streptococci isolated from blood of neutropenic cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40 (9): 2117-2120.
- Kadowaki M, Hashimoto M, Nakashima M, Fukata M, Odashiro K, Uchida Y et al. Radial mycotic aneurysm complicated with infective endocarditis caused by *Streptococcus sanguinis*. *Intern Med*. 2013; 52 (20): 2361-2365.
- Kongwattanakul K, Tribuddharat S, Prathanee S, Pachirat O. Postcaesarean open-heart surgery for *Streptococcus sanguinis* infective endocarditis. *BMJ Case Rep*. 2013; pii: bcr2013010103.
- Crump KE, Bainbridge B, Brusko S, Turner LS, Ge X, Stone V et al. The relationship of the lipoprotein SsaB, manganese and superoxide dismutase in *Streptococcus sanguinis* virulence for endocarditis. *Mol Microbiol*. 2014; 92 (6): 1243-1259.
- Mulita A, Ajayi T. *Streptococcus viridians* bacteraemia and colonic adenocarcinoma. *BMJ Case Rep*. 2014; pii: bcr2014203695.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol*. 2005; 187 (21): 7193-7203.
- Lee SH. Antagonistic effect of peptidoglycan of *Streptococcus sanguinis* on lipopolysaccharide of major periodontal pathogens. *J Microbiol*. 2015; 53 (8): 553-560.
- Stingu CS, Eschrich K, Rodloff AC, Schaumann R, Jentsch H. Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Med Microbiol*. 2008; 57 (Pt 4): 495-499.
- Ashour AZ, Belov VG, Parfenov YA, Parfenov SA, Ershov EV, Tuchin IA et al. The effectiveness of the combined use of energomonitor antioxidant and cognitive psychotherapy in the treatment of generalized periodontitis in elderly patients. *Stomatologiya (Mosk)*. 2016; 95 (2): 14-17.
- Haas AN, Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Albandar J, Oppermann RV, Rösing CK et al. Predictors of clinical outcomes after periodontal treatment of aggressive periodontitis: 12-month randomized trial. *Braz Oral Res*. 2016; 30 (1): e41.
- Izuora KE, Ezeanolue EE, Neubauer MF, Gewelber CL, Allenback GL, Shan G et al. Changes in inflammatory and bone turnover markers after periodontal disease treatment in patients with diabetes. *Am J Med Sci*. 2016; 351 (6): 589-594.
- Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015; 42 (Suppl 16): S71-76.
- Oppermann RV, Haas AN, Rösing CK, Susin C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *Periodontol 2000*. 2015; 67 (1): 13-33.
- Velano HE, do Nascimento LC, de Barros LM, Panzeri H. *In vitro* assessment of antibacterial activity of ozonized water against *Staphylococcus aureus*. *Pesqui Odontol Bras*. 2001; 15 (1): 18-22.
- Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol*. 2005; 523 (1-3): 151-161.
- Farac RV, Pizzolitto AC, Tanomaru JM, Morgental RD, Lima RK, Bonetti-Filho I. *Ex-vivo* effect of intracanal medications based on ozone and calcium hydroxide in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J*. 2013; 24 (2): 103-106.
- Kollmuss M, Kist S, Obermeier K, Pelka AK, Hickel R, Huth KC. Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms. *Am J Dent*. 2014; 27 (3): 134-138.
- Banach JL, Sampers I, Van Haute S, van der Fels-Klerx HJ. Effect of disinfectants on preventing the cross-contamination of pathogens in fresh produce washing water. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12 (8): 8658-8677.
- Khatrri I, Moger G, Kumar NA. Evaluation of effect of topical ozone therapy on salivary Candidal carriage in oral candidiasis. *Indian J Dent Res*. 2015; 26 (2): 158-162.
- Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm*. 2004; 13 (1): 3-11.
- Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*. 2002; 9 (4): 231-238.
- Boch T, Tennert C, Vach K, Al-Ahmad A, Hellwig E, Polydorou O. Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm-an *in vitro* study. *Clin Oral Investig*. 2016; 20 (7): 1733-1739.
- Zhang K, Wang S, Zhou X, Xu HH, Weir MD, Ge Y et al. Effect of antibacterial dental adhesive on multispecies biofilms formation. *J Dent Res*. 2015; 94 (4): 622-629.

26. Cury JA, Tenuta LM. Evidence-based recommendation on toothpaste use. *Braz Oral Res.* 2014; 28 Spec No: 1-7.
27. Tahmassebi JF, Droghda E, Wood SR. A study of the control of oral plaque biofilms via antibacterial photodynamic therapy. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2015; 16 (6): 433-440.
28. Hauser-Gerspach I, Vadasz J, Deronjic I, Gass C, Meyer J, Dard M et al. Influence of gaseous ozone in peri-implantitis: bactericidal efficacy and cellular response. An *in vitro* study using titanium and zirconia. *Clin Oral Investig.* 2012; 16 (4): 1049-1059.
29. Bezirtzoglou E, Cretoiu SM, Moldoveanu M, Alexopoulos A, Lazar V, Nakou M. A quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. *J Dent.* 2008; 36 (8): 600-605.
30. Zhao H, Zheng D, Hong L. The disinfection efficiency comparison of different treatments on dental impression and gypsum casts. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2000; 18 (5): 332-335.
31. Hauser-Gerspach I, Kulik EM, Weiger R, Decker EM, Von Ohle C, Meyer J. Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dental implant and restorative materials *in vitro*. *Dent Mater J.* 2007; 26 (3): 361-366.
32. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17 Suppl 2: 68-81.
33. Orellana M, Menchaca E, Nava JF, Nava N, Orellana J, Ponce S. El ozono como una alternativa para esterilizar piezas de mano y fresas en odontología. *Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatria "Ortodoncia.ws"* edición electrónica junio 2010. Disponible en: www.ortodoncia.ws. Consultada, 3/Junio/2016.
34. Eick S, Tigan M, Sculean A. Effect of ozone on periodontopathogenic species--an *in vitro* study. *Clin Oral Investig.* 2012; 16 (2): 537-544.
35. Zan R, Hubbezoglu I, Sümer Z, Tunç T, Tanalp J. Antibacterial effects of two different types of laser and aqueous ozone against *Enterococcus faecalis* in root canals. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31 (4): 150-154.
36. Tuncay Ö, Dinçer AN, Kuştarıcı A, Er Ö, Dinç G, Demirbuga S. Effects of ozone and photo-activated disinfection against *Enterococcus faecalis* biofilms *in vitro*. *Niger J Clin Pract.* 2015; 18 (6): 814-818.
37. Fontes B, Cattani Heimbecker AM, de Souza Brito G, Costa SF, van der Heijden IM, Levin AS et al. Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. *BMC Infect Dis.* 2012; 12: 358.
38. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19 (4): 240-246.
39. Millar BJ, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *J Dent.* 2007; 35 (3): 195-200.
40. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine Part 2: ozone and root caries. *Primary Dental Care.* 2006; 13: 37-41.
41. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. *Primary Dental Care.* 2005; 12: 47-52.

Correspondencia:

M. en C. Ricardo Peralta Estrada

Departamento de Estomatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, Chihuahua.

Envolvente del PRONAF y Estocolmo s/n, C.P. 32310

Tel: +55 656 688 1823.

E-mail: ricardo.peralta@uacj.mx