

Relación de la concentración del ion tiocianato salival y el recuento de bacterias aerobias en saliva en personas fumadoras y no fumadoras

List of Concentration of Salivary Thiocyanate Ion and Aerobic Bacteria Count in Saliva of Smokers and Nonsmokers People

Diana Lucía Díaz Montoya,¹ Gisele María Delgado Montoya,² Myriam Juliana Flores Valderrama³

RESUMEN

El ion tiocianato es una sustancia derivada del cianuro, el cual es metabolizado en nuestro organismo, para luego liberarse en diversos fluidos orgánicos, tales como la saliva, donde es transformado a ion hipotiocianato mediante el sistema lactoperoxidasa, atribuyéndosele una función antibacteriana. El objetivo fue relacionar la concentración del ion tiocianato salival y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias aerobias en la saliva. La concentración del ion tiocianato salival se cuantificó por espectrofotometría, luego de someter las muestras a la reacción de Köning. El recuento de las UFC se realizó después de cultivar las muestras de saliva en Agar Cuenta Colonias. La relación de ambas variables se evaluaron mediante regresión lineal y los resultados entre los distintos grupos de personas se compararon mediante la prueba de significancia de Tukey. Las personas que fumaban diariamente tuvieron concentraciones significativamente mayores ($2,27 \times 10^{-3}M$) que los fumadores interdiarios ($1,62 \times 10^{-3}M$), los fumadores sociales ($1,40 \times 10^{-3}M$) y los no fumadores ($1,33 \times 10^{-3}M$). Para el número de UFC totales hubo diferencia significativa entre los fumadores habituales (476×10^3 UFC/ml de saliva) respecto a los demás grupos, 798×10^3 UFC/ml en los que fumaban interdiario, 1012×10^3 UFC/ml en los fumadores sociales y 1101×10^3 UFC/ml en las personas no fumadoras. Al relacionarse ambas variables, se observó una muy buena fuerza de correlación ($r = -0,845$) para las bacterias aerobias totales y para estreptococos ($r = -0,718$) con la concentración de tiocianato. Por lo tanto, a mayor concentración del ion tiocianato salival, disminuirá el número de UFC de aerobios totales y por supuesto el número de estreptococos en la saliva. No existe relación entre la concentración de tiocianato salival y la cantidad de estafilococos salivales, como lo indica el coeficiente de correlación ($r = 0,415$).

Palabras clave: bacterias de la saliva, ion hipotiocianato, ion tiocianato, fumadores.

ABSTRACT

Thiocyanate ion is a substance derived from the cyanide, which is metabolized in our body and then released it in various organic fluids, such as saliva, where it is transformed by ion hypothiocyanate by lactoperoxidase system, attributing an antibacterial function. The objective was to relate the concentration of salivary thiocyanate ion and counting colony forming units (CFU) of aerobic bacteria in saliva. The salivary thiocyanate ion concentration was measured by spectrophotometry, after subjecting the samples to the reaction of Köning. CFU count was performed after culturing saliva samples in Account

¹ Bióloga. Magíster en Ciencias Biomédicas Básicas. UAP Filial Arequipa, escuelas de Ing. Ambiental y Psicología. diazmdiana@gmail.com

² Química farmacéutica. Magíster en Ciencias Biomédicas Básicas. UAP Filial Arequipa, escuelas de Farmacia y Estomatología. gisedelg@yahoo.com

³ Química farmacéutica. Dra. en Gestión y Ciencias de la Educación. UAP Filial Arequipa, escuelas de Farmacia y Psicología. julianaaqp2011@hotmail.com

Agar Colonies. The relationship of both variables were evaluated by linear regression and results among different groups of people were compared using the Tukey significance test. People who smoked daily had significantly higher concentrations ($2,27 \times 10^{-3}M$) than interdiarios smokers ($1,62 \times 10^{-3}M$), social smokers ($1,40 \times 10^{-3}M$) and nonsmokers ($1,33 \times 10^{-3}M$). For the total number of CFU was no significant difference between the current smokers (476×10^3 CFU / ml of saliva) compared to other groups, 798×10^3 CFU / ml in those who smoked intraday, 1012×10^3 CFU / ml in social smokers and 1101×10^3 CFU / ml in nonsmokers. In relating the two variables, a very good strength of correlation ($r = -0,845$) for total aerobic bacteria and streptococci ($r = -0,718$) with the thiocyanate concentration was observed. Therefore, the higher concentration of salivary thiocyanate ion, the number of CFU of total aerobic will decrease and of course the number of streptococci in saliva. There is no relationship between the concentration of salivary thiocyanate and the amount of salivary staphylococci, as indicated by the correlation coefficient ($r = 0,415$).

Palabras clave: *bacteria in saliva, hypothiocyanate ion, thiocyanate ion, smokers.*

INTRODUCCIÓN

Nuestra saliva posee una molécula antibacteriana derivada del cianuro, el ion tiocianato (SCN⁻), el cual es degradado a partir del cianuro que es ingerido en diversas fuentes de alimentos, así como también por inhalación del humo del cigarro (1). El tiocianato en la saliva es oxidado por la lactoperoxidasa a ion hipotiocianato (OSCN⁻), una molécula que tiene acción antibacteriana.

Los estreptococos forman gran parte de la flora bucal normal, sobre todo los estreptococos del grupo viridans que participan como colonizadores de la placa dental y algunos, como *Streptococcus mutans*, como agente etiológico de la caries dental. La presencia del género *Streptococcus* en la cavidad bucal, incluida la secreción salival, corresponde al 45 a 50% de la flora bacteriana (2, 6), el cual, además de ser un género fácilmente cultivable en condiciones aeróbicas, inhibe el crecimiento de muchas especies bacterianas; por lo que estos microorganismos son ideales para evaluar la actividad antibacteriana del ion hipotiocianato salival sobre la viabilidad celular de bacterias de la saliva. En el caso de los estafilococos, si bien es cierto que forman un bajo porcentaje de la flora bacteriana de la cavidad bucal, son parte de la flora normal de todos los ecosistemas orales, y crecen fácilmente en las condiciones an-

tes mencionadas, sin ser inhibidos por el desarrollo de los estreptococos, como ocurre con otros grupos bacterianos (29).

Hay un gran número de personas fumadoras frecuentes, las cuales presentan por lo general una alta concentración de tiocianato en saliva (1,8), por lo tanto, son los individuos ideales para evaluar en ellos la influencia de la concentración del tiocianato salival sobre la viabilidad de las bacterias de la saliva. También se seleccionaron personas no fumadoras como portadoras de ion tiocianato salival en condiciones normales.

MATERIAL Y MÉTODOS

La muestra estuvo constituida por 100 individuos que incluyen a personas fumadoras: los que fuman diariamente, a los que fuman interdiario, fumadores sociales y personas no fumadoras que se encuentren entre los 18 a 34 años.

Para la selección de la muestra se utilizó la técnica de encuesta y como instrumento el cuestionario, en donde se les preguntó de forma precisa cuáles son sus hábitos respecto al consumo de cigarrillos y datos que nos permitan cumplir con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión: a) Personas clínicamente sanas **fumadoras** (los que fuman diariamente,

interdiario y fumadores sociales) que se encuentren entre los 17 a 34 años. b) Personas clínicamente sanas **no fumadoras** (sin hábitos de fumar) que se encuentren entre los 17 a 34 años.

Criterios de exclusión: Personas que presenten alguna patología bucal o sistémica evidente, que se encuentren tomando alguna medicación, y/o que estén usando aparatos ortodónticos. Además se excluyen a los fumadores pasivos.

Medida de la absorbancia de tiocianato en las soluciones estándar. Se procedió a preparar una serie de soluciones standard con concentraciones de tiocianato conocidas a las que se les aplicó cloruro férrico (reacción de Köning). Estas soluciones se llevaron al espectrofotómetro VIS ZUZI 4200/20 para determinar sus absorbancias correspondientes, midiendo a la longitud de onda seleccionada en el procedimiento anterior (580 nm). Con estos datos se construyó una gráfica estándar de absorbancia versus molaridad de tiocianato férrico (5,10).

Estimación de la concentración de tiocianato salival. A continuación, se prepararon tubos de ensayo rotulados con 4 ml de la solución de FeCl_3 0,1M. Luego con la ayuda de una micropipeta, se colectó 1 ml de saliva del piso de la cavidad bucal, producida espontáneamente, de las personas fumadoras y no fumadoras seleccionadas, esta saliva se aplicó a cada tubo correspondiente. Los tubos se tapan y homogeneizan, e inmediatamente después se mide su absorbancia en el espectrofotómetro a 580nm. Finalmente, para hallar la concentración del ion tiocianato, se interpolaron las medidas de absorbancia con la gráfica estándar establecida en el anterior procedimiento.

Establecimiento de la dilución adecuada de saliva para el conteo de UFC. Se realizó la estandarización de bacterias de la saliva, para lo cual se toma con la ayuda de una micropipeta

la cantidad de 1 ml de saliva producida naturalmente, luego esta se diluye en una batería de 10 tubos con diluciones sucesivas en suero fisiológico desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-10} . De cada tubo se siembra 1ml en placas Petri, a las que se les añadió 15ml Agar Cuenta Colonias, y luego realizó un movimiento suave en 8 para mezclar ambas soluciones (cada dilución se evaluó por triplicado). Estas placas se llevan a la estufa a 37 °C durante 24 horas. Por último, se realizó el conteo de UFC y se escogió la dilución de la placa que correspondía al conteo que esté entre 30 a 300 UFC. En este ensayo se estableció la dilución de 1×10^{-3} .

Caracterización cultural, microscópica y bioquímica de las UFC del medio Agar Cuenta Colonias. Para la comprobación que son colonias de estreptococos y estafilococos se realizó primeramente una caracterización cultural describiendo el diámetro, forma, color, elevación, luz transmitida, superficie y margen de las colonias. Luego se realiza una coloración de Gram y se visualiza al microscopio para comprobar morfología y agrupación. Finalmente se realiza la prueba de la catalasa para diferenciar estafilococos de estreptococos.

Evaluación del número de unidades formadoras de colonias. Para cada sujeto de estudio se realizó un muestreo a media mañana de 1 ml de saliva producida naturalmente con ayuda de una micropipeta. Esta muestra se diluyó en un tubo con suero fisiológico a la dilución de 1×10^{-3} , a continuación de dicho tubo se sembró 1 ml en placa por triplicado, se mezcló con el Agar Cuenta Colonias y se llevó a la estufa a 37 °C durante 24 horas. Se hizo el conteo de UFC de aerobias totales, de estreptococos y de estafilococos, luego se sacó el promedio de las tres placas para cada sujeto de estudio. Finalmente, estos resultados se multiplicaron por 1000, para regresar al número de bacterias salivales por 1 ml antes de someterlas a dilución.

Registro y evaluación de los datos. Se registraron los datos de los participantes y sus resultados en una tabla como la que aparece a continuación, y luego se realizó un análisis de correlación entre la concentración de tiocianato (Molaridad) y el número de UFC/ml de saliva de aerobias totales, de estreptococos y de estafilococos por separado para establecer la relación entre estas dos variables.

Análisis y procesamiento de los datos. Para el procesamiento de datos se utilizaron los programas SPSS versión 17 y Excel 2010. Se realizaron tablas univariadas para expresar las frecuencias absolutas y relativas porcentuales de las variables cualitativas y para la comparación de las variables cuantitativas como concentración de tiocianato y UFC se aplica el ANOVA con el test de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

Para la relación entre la concentración de tiocianato y las UFC se aplicó la regresión lineal simple y el coeficiente de correlación de Pearson (r). Finalmente se realizaron gráficos de barras para las comparaciones y para la regresión lineal gráficos de dispersión de puntos.

RESULTADOS

La figura 1 nos muestra la relación entre la concentración del tiocianato en la saliva y las UFC de aerobios totales también en saliva; podemos apreciar que a medida que la concentración de tiocianato se incrementa las UFC de aerobios totales disminuye.

La ecuación de la regresión lineal nos indica que por cada molar de tiocianato de incremento en la saliva, el número de UFC de aerobios totales en saliva disminuye en 519×10^3 UFC/ml. Asimismo, se observa que ambas variables tienen una muy buena fuerza de correlación ($r = -0,845$).

La figura 2 nos muestra la relación entre la concentración del tiocianato en la saliva y las UFC de estreptococos también en saliva; podemos apreciar que a medida que la concentración de tiocianato se incrementa en saliva las UFC de estreptococos disminuye.

La ecuación de la regresión lineal nos indica que por cada molar de tiocianato de incremento en la saliva el número de UFC de estreptococos en sa-

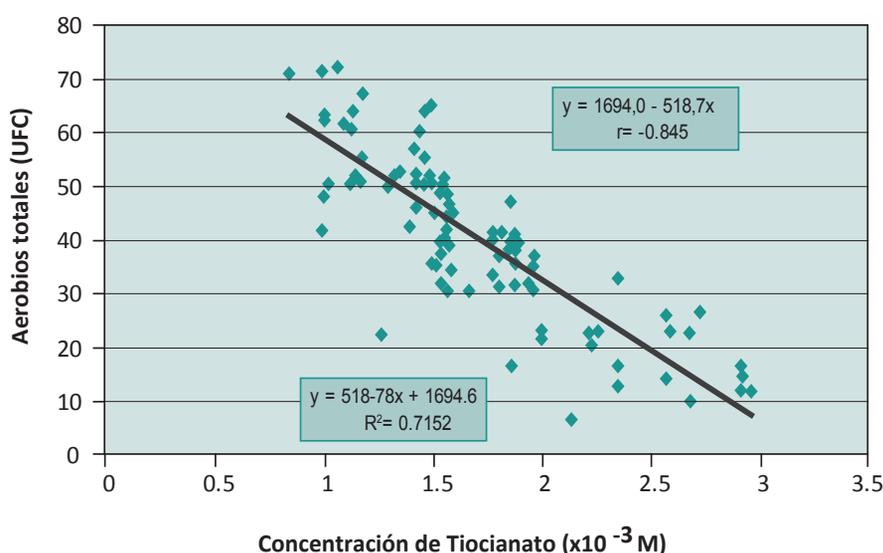


Figura 1. Relación entre la concentración de tiocianato y el número de unidades formadoras de colonias de aerobios totales.

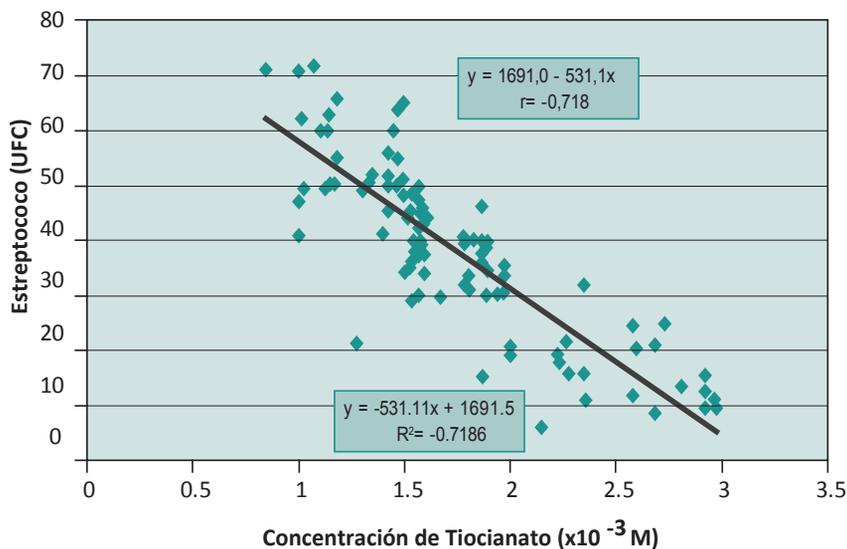


Figura 2. Relación entre la concentración de tiocianato y el número de unidades formadoras de colonias de estreptococos.

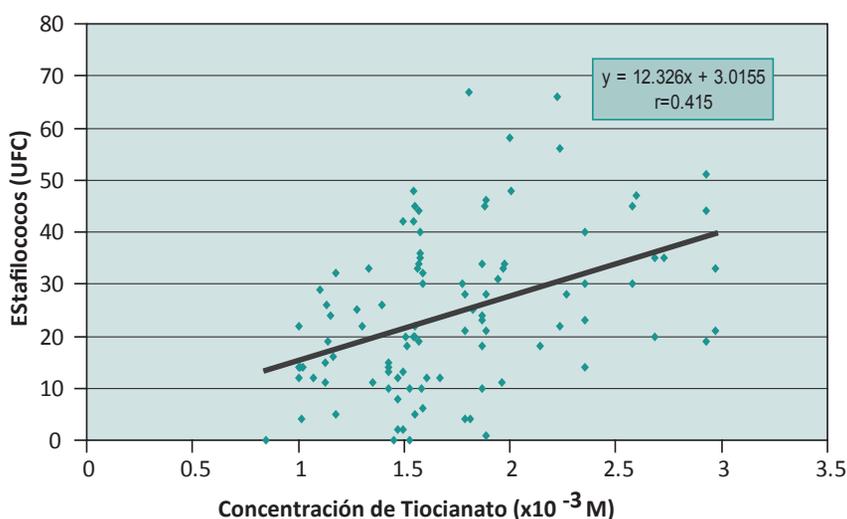


Figura 3. Relación entre la concentración de tiocianato y el número de unidades formadoras de colonias de estafilococos.

liva disminuye en 531×10^3 UFC/ml. Asimismo, se observa que ambas variables tienen una muy buena fuerza de correlación ($r = -0,718$).

La figura 3, nos muestra que no hay una buena fuerza de relación entre la concentración del tiocianato salival y las UFC de estafilococos salivales, como lo corrobora el coeficiente de correlación ($r = 0,415$).

DISCUSIÓN

En el análisis de regresión lineal entre la concentración del tiocianato en la saliva y el recuento de las UFC de aerobios totales también en saliva, se observó una muy buena fuerza de correlación negativa ($r = -0,845$), es decir, a medida que se incrementa la concentración de tiocianato, el número de UFC de aerobios totales disminuye

(Figura 1). Asimismo, al momento de analizar la relación de la concentración de tiocianato y el número de UFC de estreptococos aerobios, se encontró también una buena fuerza de correlación negativa ($r=-0,718$), vale decir, que al aumentar la concentración de tiocianato en la saliva, el número de UFC de estreptococos salivales disminuye (Figura 2). Entonces, si los estreptococos constituyen más del 90% de la flora aerobia de la saliva (15,16), esta disminución del número de aerobios totales debe de producirse específicamente sobre los estreptococos, sin influir sobre el crecimiento de los estafilococos, como lo indica el análisis de regresión para UFC de estafilococos donde no se encontró una buena relación con la concentración de tiocianato salival ($r=0,415$) (Figura 3).

Según estos resultados las altas concentraciones del ion tiocianato salival de los fumadores disminuyen el número de UFC aerobias totales y estreptococos, debido a que el tiocianato, al ser el sustrato del sistema lactoperoxidasa salival, produce una mayor conversión a las moléculas antibacterianas producto de este sistema, ion hipotiocianato y ácido hipocianoso (8,9,10), que en los no fumadores. Esta acción antibacteriana por parte de este sistema tiocianato-peróxido de hidrógeno-lactoperoxidasa forma parte importante del sistema inmune innato, no sólo en la cavidad bucal sino en otras zonas del organismo donde hay microflora bucal (11); buscando la disminución del número de colonias de estreptococos bucales, para llegar a un equilibrio poblacional, sin eliminarlos totalmente, ya que si bien es cierto, algunas especies pueden llegar a ser patológicas (*Streptococcus mutans*, *S. mitis*), también muchas especies de este género forman parte de nuestra flora bucal normal (*Streptococcus salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mutans*, etc.).

Los estudios microbiológicos realizados durante los 10 a 20 últimos años corroboran la eficacia antibacteriana y antiviral del sistema LP, seña-

lando una correlación también inversamente proporcional a la densidad de células bacterianas (5, 12, 13, 9, 10, 11, 14). La eficacia antibacteriana del sistema LP es escasa con concentraciones bacterianas altas, fundamentalmente bacteriostática con concentraciones intermedias y principalmente bactericida con concentraciones bajas. Sin embargo, en este estudio sí se ha observado su acción bacteriostática frente a aerobios totales y estreptococos orales, a pesar de la alta concentración bacteriana.

Con respecto a la acción inhibitoria no determinante del tiocianato salival sobre los estafilococos orales, tal vez se podría adjudicar a que estas bacterias, a diferencia de los estreptococos, producen catalasa; siendo probable que esta enzima esté capturando el peróxido de hidrógeno, molécula que por sí sola tiene menor efectividad antibacteriana, pero al eliminarse del medio, ya no habría sustrato que done el oxígeno para la oxidación del tiocianato a hipotiocianato mediante el sistema LP (14).

Esto no significa que habría que consumir cigarrillos para obtener tiocianato salival, ya que el consumo de tabaco produce alteraciones en el organismo mucho más perjudiciales que el beneficio de su consumo para inhibir enfermedades bucales, por lo que el tiocianato se podría consumir en suficiente cantidad en alimentos cianogénicos y/o productos de limpieza oral a concentraciones no tóxicas para nuestro organismo.

REFERENCIAS

1. Nolte, W. 1985. *Microbiología Odontológica*. Edit. Interamericana, México.
2. Kineman, E. 1992. *Diagnóstico Microbiológico*. Edit. Médico-Panamericana, Argentina.
3. Rodríguez C., E. y J. Hernández F. 2001. *Niveles séricos de ión tiocianato en la población cubana*. Anuario Toxicología 2001; 1(1):109-12.

4. Ruiz M., S. 1982. *Influencia de la presencia de glucosa en el medio de cultivo sobre el desarrollo bacteriano de productos fermentados*. Archivos de Medicina Veterinaria. Vol. XIV, N°1, Univ. Austral de Chile.
5. Thomas, Edwin & Thomas, Aune. 1978. *Lactoperoxidase, Peroxide, Thiocyanate Antimicrobial System: Correlation of Sulfhydryl Oxidation with Antimicrobial Action*. Infection and Immunity, May 1978, p. 456-463.
6. Lundquist, P. 1992. *Determination of Cyanide and Thiocyanate in Humans*. Linkoping University Medical Dissertations, N°355, Sweden.
7. Triana M., M. y H. Fé M. 1999. *Tiocianato sérico: un marcador bioquímico para discriminar fumadores de no fumadores*. Rev. Cubana Hig. Epidemiol. 1999; 37(3):141-5.
8. Ross, P. y P. Holbrook 1985. *Microbiología Bucal y Clínica*. Edit. Científica, México, D.F. 182 pp.
9. Ordóñez P., Juan y col. AESA-2005-012. *Opinión del Comité científico de la AESA sobre la utilización del sistema CATALIX® (basado en la activación del sistema lactoperoxidasa) como tratamiento higienizante de frutas y hortalizas para su comercialización*.
10. Welk, A. y col. 2009. *Effect of lactoperoxidase on the antimicrobial effectiveness of the thiocyanate hydrogen peroxide combination in a quantitative suspension test*. Microbiol. 2009; 9: 134.
11. Cegolon, L. et al. 2013. *In vitro antiviral activity of hypothiocyanite against A/H1N1/2009 pandemic influenza virus*. International Journal of Hygiene and Environmental Health Disponible online: 14 marzo, 2013.
12. www.saludalia.com/Saludalia/privada/web_club/doc/tabaco/doc/definicion_concepto.htm.
13. WHO Guidelines for Drinking-water Qual to investigationity. World Health Organization 2009. *Cyanide in Drinking-water* En: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp8.pdf.
14. WHO. 2005. *Beneficios y riesgos potenciales del sistema LP en la conservación de la leche cruda*. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/Lactoperoxidase_sp.pdf.
15. Liébana, J. 2002. *Microbiología Oral*. Edit. Mc Graw- Hill- Interamericana, España.
16. Negroni, M. 1999. *Microbiología Estomatológica*. Edit. Médica Panamericana, Argentina.