

HALITOSIS Y SU RELACIÓN CON MICRORGANISMOS ORALES Y ACTIVIDAD B-GLICOSIDASA EN ESTUDIANTES DE LA FO-UATx

Aurora Lucero Reyes^{1,2}

Elvia Ortiz Ortiz²

Estela Cuevas Romero¹

Margarita Martínez Gómez^{1,3}

María de los Ángeles Carrasco Ruiz^{2*}

¹Universidad Autónoma de Tlaxcala; Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta; México, La Loma Xicohtencatl, 90070 Tlaxcala de Xicohtencatl, Tlaxcala

²Universidad Autónoma de Tlaxcala; Facultad de Odontología, Av. Ribereña S/N, Centro, 90000 Tlaxcala de Xicohtencatl; Tlaxcala

³Universidad Nacional Autónoma de México; Instituto de Investigaciones Biomédicas, Unidad Foránea Tlaxcala; La Loma Xicohtencatl, 90070 Tlaxcala de Xicohtencatl.

Correo: auroraluceroreyes@gmail.com

RESUMEN

Introducción. La halitosis se refiere a un aroma desagradable emitido por la cavidad oral, es un problema común en la sociedad, se presenta en individuos de todas las edades, en etapa estudiantil puede causar inseguridad que podría impactar psicológica y emocionalmente. *Objetivo.* Relacionar microorganismos orales y la actividad β -glicosidasa con halitosis en estudiantes de Odontología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx). *Metodología.* Se realizaron 3 lecturas a jóvenes estudiantes de la Facultad de Odontología (UATx), usando un halímetro, se tomó una muestra de saliva, posterior a ello se les entregó cera rosa para estimular el flujo salival y se realizaron 3 lecturas nuevamente, seguido de una nueva toma de muestra salival. Las muestras se utilizaron para el análisis microbiológico, y mediciones de pH, flujo salival y actividad enzimática de β -glicosidasa. El análisis estadístico se realizó usando el programa Graphpad 9.3 para Windows. *Resultados.* Las estudiantes de la Facultad de Odontología presentaron mayor incidencia de halitosis (Mann Whitney test, $P=0.0141$), pero un conteo menor en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Sreptococcus mutans* (MW, $P=0.0471$), y *Lctobacillus spp* (MW, $P=0.0316$) vs los hombres, el flujo salival y el pH fue similar entre ambos géneros y la actividad de β -glicosidasa fue mayor en mujeres (t.s., $P=0.0189$). *Conclusión.* La halitosis es multifactorial, en estudiantes de la Facultad de Odontología UATx se mostró mayor índice de halitosis en mujeres sin embargo no es por una mala higiene, sugiriendo una diferencia entre géneros posiblemente por un factor hormonal.

Palabras clave: Halitosis, género, microorganismos, actividad enzimática

ABSTRACT

Introduction. The halitosis refers to an unpleasant aroma emitted from oral cavity. It is a common problem in society that occurs in individuals of all ages. During the adolescent stage, it can cause insecurity that could impact psychologically and emotionally. *Objective.* To relate oral microorganism and β -glycosidase activity with halitosis in Dentistry students at the Universidad Autonoma de Tlaxcala (UATx). *Methodology.* We perform 3 readings students of the Faculty of Dentistry (UATx) using a halimeter, a saliva sample was taken, after which they were given pink wax to stimulate salivary flow, 3 readings were carried out again and a new sample was taken. The samples were used for microbiological analysis, measurement of pH, salivary flow and β -glycosidase enzymatic activity. Statistical analysis was performed using Graphpad 9.3 for Windows. *Results.* The girl's students of the Faculty of Dentistry presented a higher incidence of halitosis than boys (Mann Whitney test, $P=0.0141$), but a lower count in the number of colonies forming units (CFU) of *Streptococcus mutans* (Mann Whitney test, $P=0.0471$), and *Lactobacillus spp* (Mann Whitney test, $P=0.0316$) vs boys, salivary flow and pH were similar between both genders and β -glycosidase activity was higher in girls (Student's t, $P=0.0189$). *Conclusion.* Halitosis is multifactorial, in students at the UATx Faculty of Dentistry a higher rate of halitosis was shown in women, however it is not due to poor hygiene, suggesting a difference between genders possibly due to a hormonal factor.

Keywords: Halitosis, gender, microorganisms, enzymatic activity

INTRODUCCIÓN

La halitosis es un problema de salud mundial que incluye a la población en un amplio rango de edad, entre los factores para padecerla se encuentra patologías a nivel bucal como la enfermedad periodontal, gingivitis y caries (Wu et al., 2020). La aparición de caries incluye la participación de los microorganismos como *Streptococcus mutans* y *Lctobacillus spp* (Gao et al., 2016). Dicho microbioma tiene un efecto en la modulación del pH salival, así mismo, el microbioma puede ser regulado por el flujo salival, por esta razón estos factores también podrían influir en el problema de halitosis (Gao et al., 2016; Marsh et al., 2000). La actividad de ciertas enzimas que participan en la degradación de azúcares como β galactosidasa y β glucosidasa tienen efecto directo para padecer halitosis (Aliyev et al., 2020; Teixeira et al., 2021). Además de los factores a nivel bucal existen otros que pueden ocasionar halitosis, como patologías a nivel sistémico: diabetes mellitus, problemas gastrointestinales y patologías de hígado y riñón (Messadi et al., 2003),

considerando la halitosis como un padecimiento multifactorial y que aparece en todas las edades, es importante atenderla desde varios y diferentes aspectos.

La evaluación de la halitosis en la población joven es de gran importancia ya que podría tener impacto directo en las relaciones sociales y la calidad de vida e influir en problemas de ansiedad y depresión (McKeown, 2003; Suzuki et al., 2008). La investigación de la salud oral de forma temprana puede ser de gran relevancia para el desarrollo de medidas preventivas y estrategias de motivación para una mejor higiene bucal (Alyahya, 2016). La halitosis es un padecimiento multifactorial que impacta negativamente en las interacciones sociales y debe ser entendido por los profesionales de salud para diagnosticar y tratar de manera adecuada a sus pacientes (Wu et al., 2020). El objetivo de esta investigación fue: correlacionar diversas variables como el número de microorganismos, el flujo salival, el pH y la actividad de β -glucosidasa, con halitosis en estudiantes de Odontología de la universidad Autónoma de Tlaxcala

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio de escrutinio, transversal, prolectivo y homodémico, con una muestra de 15 mujeres y 14 hombres todos estudiantes de la Facultad de Odontología de la UATx. Se hizo la invitación a estudiantes a participar en el estudio, se les solicitó firmaran un consentimiento informado y se realizó una historia clínica, se seleccionó la muestra considerando los siguientes criterios de selección: alumnos de ambos géneros inscritos a la Facultad de odontología, que cursaran séptimo y octavo semestre (edad entre 20 a 22 años), sin patologías sistémicas. Los criterios de eliminación fueron los estudiantes que no aceptaron participar o firmar el consentimiento informado.

Toma de muestras y determinación de halitosis

Las condiciones para la toma de muestras y lecturas fueron las siguientes: tener ayuno de 8 horas, sin cepillado previo a la toma, sin consumo de alcohol y/o fármacos 8 días antes. Las lecturas se realizaron usando un halímetro (Marca: internacional, Catalogo No. 4566778), que muestra una lectura de 0 a 5, se registraron 3 lecturas por individuo y se obtuvo el promedio, posterior a la toma de la lectura se procedió a la toma de muestra de saliva, se utilizó un tubo cónico de 15ml, se les solicitó escupir durante 5 minutos y se procedió cerrar el tubo, la lectura y la toma de muestra se realizó nuevamente usando cera rosa para estimular la secreción salival siguiendo el mismo procedimiento.



Medición de pH, flujo salival y cuantificación de Streptococcus mutans y Lactobacillus spp

La medición de pH se realizó en ambas muestras usando un potenciómetro (Thermo Orion), el flujo salival se determinó con la diferencia de la toma de muestra 1 vs la toma de muestra 2. Se utilizó la muestra 1, para realizar la siembra de microorganismos en medios sólidos: Agar Mitis Salivarius (AMS, BD Difco catálogo 229810) adicionado con 0.1% de Telurito de potasio (Sigma P0677) y 5% de sacarosa (Meyer catálogo 2240). Y Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Dibico catálogo 1267). Todos de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se incubaron en condiciones de anaerobiosis usando una jarra Meyer y GasPak (BBL 70304) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, durante 72 horas, de las colonias que crecieron en el AMS se realizó la prueba de catalasa positiva y tinción de Gram, para los medios solidos se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Para todos los casos se utilizó un control negativo para demostrar la eficacia de la esterilización de medios de cultivo.

Determinación de actividad β -glucosidasa

De las muestras 1, se almacenó 1 ml de saliva para cuantificar la actividad de β -glucosidasa, de acuerdo al protocolo de Teixeira (2021), la reacción se realizó usando buffer de Fosfatos 20Mm, pH 7.2, se le adicionó 0.075 ml de saliva y 1Mm de 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, se incubaron 60 minutos a 37°C , la solución de stop se realizó con 250 μl de una solución 1M de Na^2CO^3 las lecturas se realizaron utilizando un espectrofotómetro (Jenway 6305) a 405 nm.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó de acuerdo a la normalidad y naturaleza de los datos, en todos los casos para determinar diferencias entre grupos se consideró $P \leq 0.05$. Se usó el programa de análisis estadístico Prism 9.3.0 para Windows (GraphPad).

RESULTADOS

Los resultados mostraron mayor incidencia de halitosis en las estudiantes de la Facultad de odontología (Mann Whitney test, $P=0.0141$, fig. 1A). La actividad de β -glucosidasa fue mayor en mujeres (t de student, $P=0.0189$, fig. 1B). El flujo salival (t de student, $P= 0.1851$, Fig. 1C) y el pH (t de student, $P= 0.1539$, Fig. 1D) fueron similares entre ambos géneros.

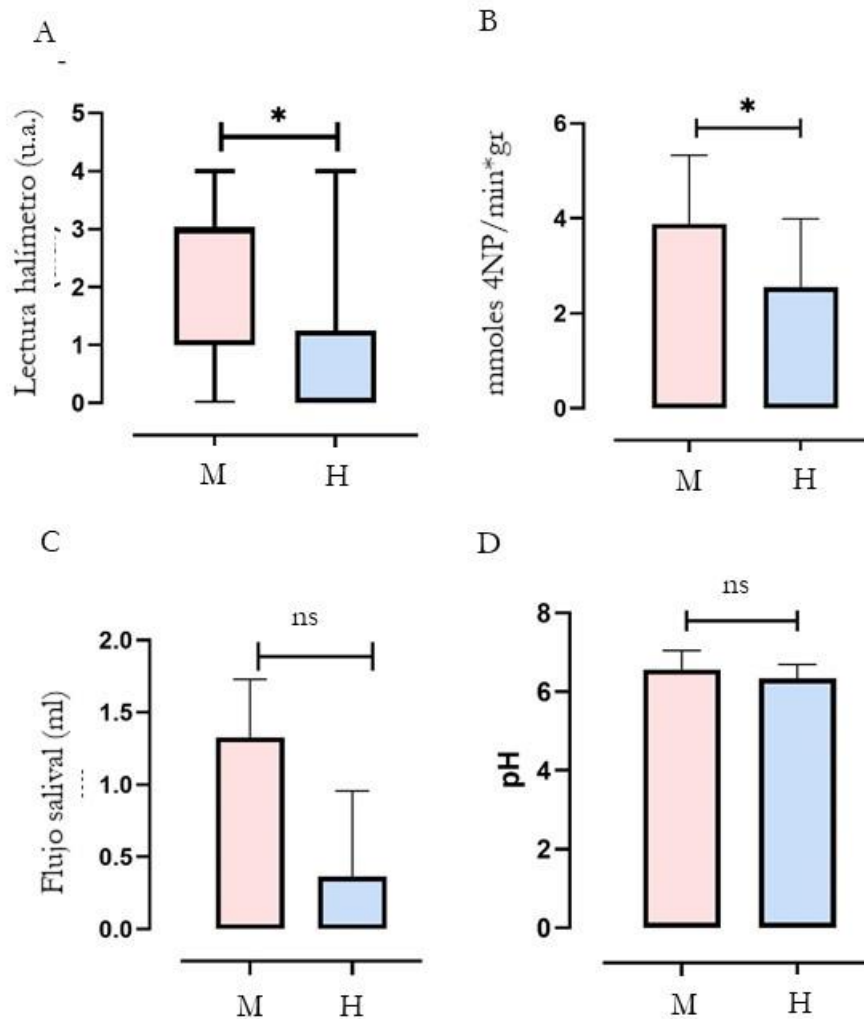


Figura 1. (A) Lectura de halímetro, se representa la mediana \pm mínimos y máximos. (B) Actividad enzimática de β -glicosidasa (C), flujo salival y (D) pH salival. Se representa la media \pm desviación estándar. Tamaño de muestra, mujeres n=15, hombres n=14.

Cuantificación de UFC de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp*

En mujeres se observó un conteo menor en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* (Mann Whitney test, $P=0.0471$, fig. 2C) vs los hombres, el conteo de UFC de *Lactobacillus spp* (Mann Whitney test, $P=0.0316$, figura 2D).

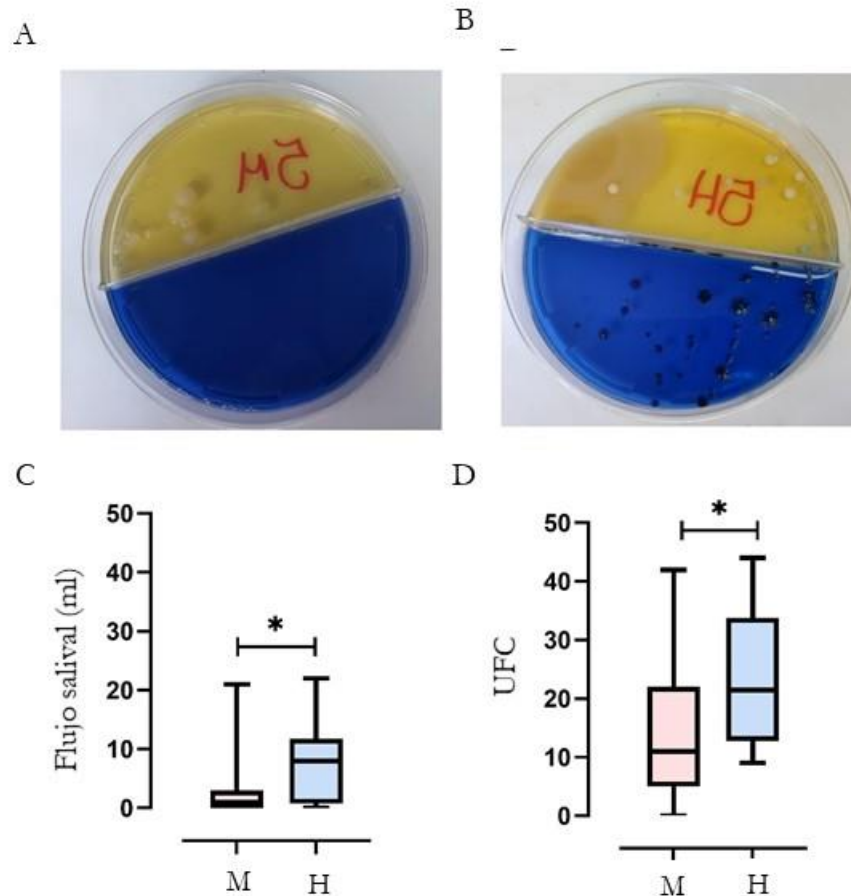


Figura 2. (A) Imagen representativa de los medios de cultivo agar Mitis salivarius (*Streptococcus mutans*) y agar MRS *Lactobacillus spp* en mujeres y (B) en hombres. (C) Conteo de unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* y (D) *Lactobacillus spp*. Se representa la mediana \pm mínimos y máximos. Tamaño de muestra, mujeres n=15, hombres n=14.

Correlación de halitosis con microorganismos orales, pH, flujo salival y actividad β -glucosidasa

En mujeres hubo correlación de la actividad de β glucosidasa y la lectura realizada con el halímetro (Spearman, $r = 0.5588$; $P = 0.0325$, fig. 3A), se observó una mínima correlación con el flujo salival (Spearman, $r = 0.5091$; $P = 0.0773$, fig. 3A), sin embargo, no existió correlación de la lectura del halímetro y el Ph (Spearman, $r = 0.1889$; $P = 0.4979$, fig. 3A) y tampoco con el número de UFC de *streptococcus mutans* (Spearman, $r = 0.08946$; $P = 0.7472$, fig. 3A) y *Lactobacillus spp* (Spearman, $r = 0.1850$; $P = 0.5071$, fig. 3A). En hombres ninguna de las variables mostro correlación con la lectura arrojada por el halímetro (Spearman, $r = 0.2411$, -0.06592 , 0.1493 , -0.09235 , -0.150 ; $P > 0.05$, fig. 3B).

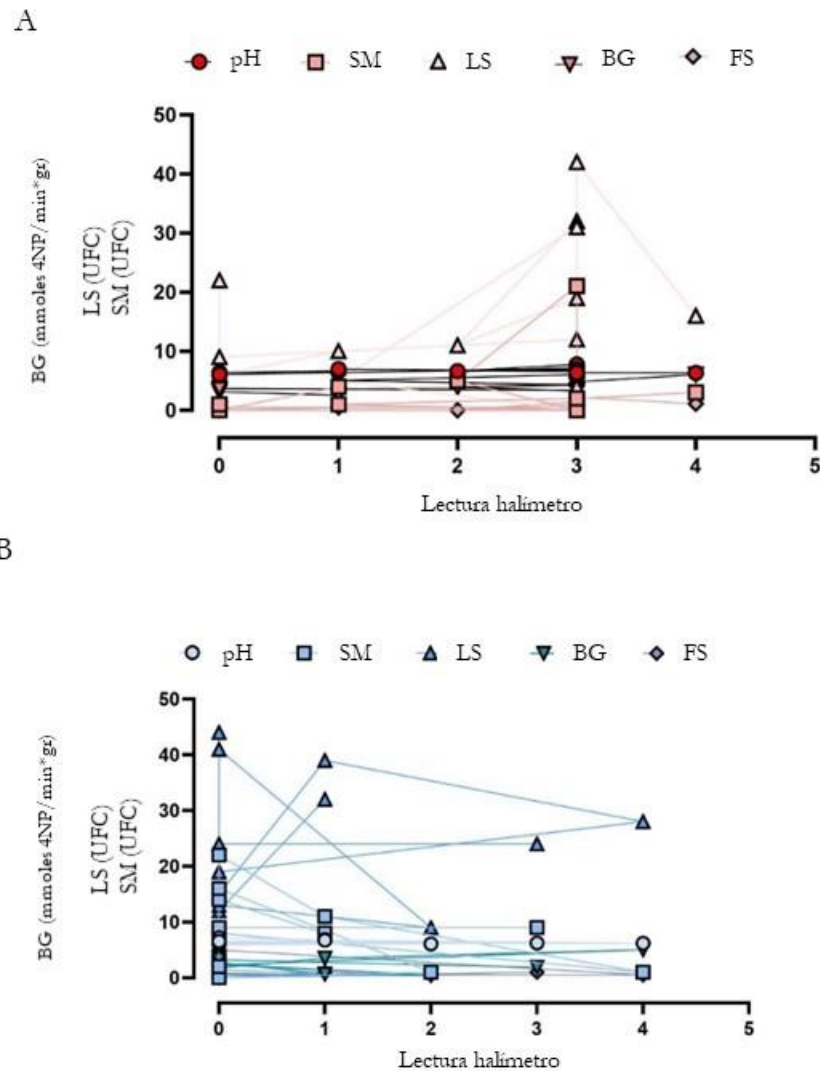


Figura 3. (A) Correlación de halitosis con pH, *Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus spp* β -glicosidasa (BG) y flujo salival en mujeres, (B) en hombres. Correlación de Spearman. Tamaño de muestra, mujeres n=15, hombres n=14.

DISCUSIÓN

Existen varios métodos para determinar halitosis, entre los métodos más sencillos y económicos se encuentra el análisis organoléptico, sin embargo, por motivos de contingencia fue necesario incluir otros métodos como el uso de ciertos dispositivos para su cuantificación, en la investigación se usó un dispositivo que indicó los niveles de halitosis en los estudiantes de la Facultad de Odontología (UATx), mostrando lectura bajas en los niveles de halitosis y se demostró mayor incidencia en mujeres. Los

estudiantes de odontología tienen una menor prevalencia de padecer halitosis, probablemente por el interés de mantener su higiene bucal (Bin et al., 2007; Al-Atrooshi et al., 2007), en esta investigación únicamente se comparó a la población entre géneros de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Aunque las mujeres mostraron mayor índice de halitosis, el número de UFC de ambos microorganismos cuantificados en este estudio fue menor en las mujeres, por consiguiente, no hubo correlación entre la halitosis y las UFC de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp*, microorganismos asociados a la caries (Gao et al., 2016). Una de las razones entre géneros podría ser debido a hábitos respiratorios los cuales se han asociado con halitosis sin asociarse con caries y/o gingivitis (Alqutami et al., 2019). Así mismo Donaldson et al., 2005 mencionan no existe una relación específica entre los microorganismos y la halitosis, pero la interacción de los mismos sí influye para padecerla. Estudios realizados en población adolescente mostraron que las mujeres tienen un régimen más riguroso de higiene que los hombres (Bigler & Filipi 2015) razón por la que se podría haber encontrado este resultado con respecto a los microorganismos orales cuantificados.

Considerando los hallazgos con respecto a la diferencia para padecer halitosis por el género, se podría sugerir, se relaciona a fluctuaciones hormonales de ciclo menstrual. Al respecto se ha mencionado que el ciclo menstrual se asocia para sufrir de halitosis ya que las hormonas esteroides podrían estar modulando los compuestos volátiles de azufre, el flujo salival y algunas proteínas salivales (Calil et al., 2008). Si bien no hubo una diferencia entre géneros con respecto al flujo salival se observa una leve correlación entre la halitosis en mujeres que no se observa en hombres. Misma que pudiera influir incluso en el arrastre de los microorganismos bucales (Marsh et al., 2000). En trabajos futuros será necesario incluir la cuantificación de hormonas esteroides en saliva para poder relacionarlas con halitosis, realizar un examen para determinar la salud bucodental de los estudiantes, así mismo, realizar un estudio con una población en la que participen un mayor número de individuos.

CONCLUSIÓN

Los resultados mostraron diferencia por género en la población estudiada, se demostró existe una relación entre la actividad enzimática de β -glicosidasa y la halitosis, que la carga bacteriana puede o no asociarse directamente con esta patología. Los resultados mostraron que la halitosis es una patología multifactorial, si

bien hubo mayor índice de halitosis en mujeres no es por una mala higiene, sugiriendo una diferencia entre géneros posiblemente por un factor hormonal.

REFERENCIAS

- AL-ATROOSHI BA, AL-RAWI AS. (2007). Oral halitosis and oral hygiene practices among dental students. *J Baghdad Coll Dent* 19:72–76. <https://www.iasj.net/iasj/download/bbae173db481d9e2>
- ALQUTAMI, J., ELGER, W., GRAFE, N., HIEMISCH, A., KIESS, W., & HIRSCH, C. (2019). Dental health, halitosis and mouth breathing in 10-to-15-year-old children: A potential connection. *European journal of paediatric dentistry*, 20(4), 274–279. <https://doi.org/10.23804/ejpd.2019.20.04.03>
- ALIYEV, B., PASAOGLU, O., PASAOGLU, H., GUNGOR, K., GUNER, E., CELIK, B., & TUTER, G. (2021). Salivary β -galactosidase, halitosis parameters in periodontal health and disease, and their changes after periodontal treatment. *Australian dental journal*, 66(4), 377–384.
- ALYAHYA L. (2016). Parental knowledge and practices regarding their children's oral health in Kuwait. *European journal of paediatric dentistry*, 17(4), 267–273. <https://doi.org/10.1111/adj.12860>
- BIGLER, T., & FILIPPI, A. (2016). Importance of halitosis. A survey of adolescents and young adults. *Swiss dental journal*, 126(4), 347–359.
- BIN MUBAYRIK, A., AL HAMDAN, R., AL HADLAQ, E. M., ALBAGIEH, H., ALAHMED, D., JADDOH, H., DEMYATI, M., & ABU SHRYEI, R. (2017). Self-perception, knowledge, and awareness of halitosis among female university students. *Clinical, cosmetic and investigational dentistry*, 9, 45–52. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S129679>
- CALIL, C. M., LIMA, P. O., BERNARDES, C. F., GROPPPO, F. C., BADO, F., & MARCONDES, F. K. (2008). Influence of gender and menstrual cycle on volatile sulphur compounds production. *Archives of oral biology*, 53(12), 1107–1112. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.06.008>
- DONALDSON, A. C., MCKENZIE, D., RIGGIO, M. P., HODGE, P. J., ROLPH, H., FLANAGAN, A., & BAGG, J. (2005). Microbiological culture analysis of the tongue anaerobic microflora in subjects with and without halitosis. *Oral diseases*, 11 Suppl 1, 61–63. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01094.x>

- 
- GAO, X., JIANG, S., KOH, D., & HSU, C. Y. (2016). Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology 2000*, 70(1), 128–141. <https://doi.org/10.1111/prd.12100>
- MESSADI, D. V., & YOUNAI, F. S. (2003). Halitosis. *Dermatologic clinics*, 21(1), 147–viii. [https://doi.org/10.1016/s0733-8635\(02\)00060-8](https://doi.org/10.1016/s0733-8635(02)00060-8)
- MARSH, P. D., DO, T., BEIGHTON, D., & DEVINE, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), 80–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12098>
- MCKEOWN L. (2003). Social relations and breath odour. *International journal of dental hygiene*, 1(4), 213–217. <https://doi.org/10.1034/j.1601-5037.2003.00056.x>
- TEIXEIRA ESSENFELDER, L., GOMES, A. A., COIMBRA, J. L. M., MOREIRA, M. A., FERRAZ, S. M., MIQUELLUTI, D. J., FELIPPE DA SILVA, G., & MAGALHÃES, M. L. B. (2021). Salivary β -glucosidase as a direct factor influencing the occurrence of halitosis. *Biochemistry and biophysics reports*, 26, 100965. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100965>
- WU, J., CANNON, R. D., JI, P., FARELLA, M., & MEI, L. (2020). Halitosis: prevalence, risk factors, sources, measurement and treatment - a review of the literature. *Australian dental journal*, 65(1), 4–11. <https://doi.org/10.1111/adj.12725>