

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Evaluación de la combinación de clorhexidina y *Aloe vera* sobre la carga bacteriana oral *in vivo* e *in vitro* en perros domésticos

Por:

Ana Sofía Gómez Luna

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título del:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Septiembre 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Evaluación de la combinación de clorhexidina y *Aloe vera* sobre la carga bacteriana oral *in vivo* e *in vitro* en perros domésticos

Por:

Ana Sofía Gómez Luna

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título del:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Tesis que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Dra Jessica María Flores Salas
Presidente

Dr Ramón Alfredo Delgado González
Vocal

MVZ César Octavio Cruz Marmolejo
Vocal

MC Diana Elizabeth Salazar Nevárez
Vocal Suplente

MC José Luis Francisco Sandoval Elías
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Septiembre 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Evaluación de la combinación de clorhexidina y *Aloe vera* sobre la carga bacteriana oral *in vivo* e *in vitro* en perros domésticos

Por:

Ana Sofía Gómez Luna

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título del:

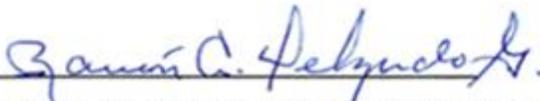
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra Jessica María Flores Salas

Asesor Principal



Dr. Ramón Alfredo Delgado González

Coasesor



MVZ Cesar Octavio Cruz Marmolejo

Coasesor


MC José Luis Francisco Sandoval Elías

Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México

Septiembre 2023

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a los honorables profesores de esta institución, quienes a lo largo de mis años de estudio me han orientado, apoyado y transmitido sus conocimientos en el aula y fuera de ella cuando lo necesité, y que hoy en día marcaron mi vida estudiantil y profesional.

A mis amigos y ahora colegas que estuvieron conmigo, y con los cuales nos reconfortamos cuando todo se ponía difícil, apoyándonos a seguir este camino para el cual ya estábamos destinados compartir.

Agradezco a Andrea Ocampo por orientarme y compartir sus conocimientos conmigo en todo momento en el laboratorio, y nunca dudar de mi capacidad para lograr este proyecto.

Y sobre todo a Victoria por la confianza que depositó en mí para hacer realidad este proyecto.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar el presente trabajo a mis padres, por siempre dar todo de su parte y apoyarme en cualquier decisión que tome sin dudar de mi potencial, por su disposición de siempre llevarme a la Universidad sin importar la hora, por estar pendiente de las necesidades y el material que la carrera conlleva, les dedico éste y cada uno de mis triunfos, ya que sin ellos no sería posible, gracias por confiar en este ser rebelde.

A mis amigas de toda la vida, Ivette, Paloma, Jacqueline y Fernanda por siempre estar detrás de mí ayudándome con ese empujoncito que necesitaba cuando estaba a punto de rendirme.

A mi compañero de vida Ángel por ayudarme a ver mis fortalezas y mi capacidad de lograr mis sueños, gracias por confiar en mí.

Y a mi mejor amigo Jack, por ser mi motor, por acompañarme a mis clases y ser la razón por la cual me seguiré esforzando día a día para ser mejor persona y crecer profesionalmente.

RESUMEN

Las enfermedades periodontales afectan a cerca del 80-90% de los perros mayores de tres años. Un antiséptico probado para su tratamiento es la clorhexidina. Sin embargo, con el incremento de la resistencia antibiótica, se buscan otras alternativas como el *Aloe vera*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la combinación de clorhexidina y *Aloe vera* sobre la carga bacteriana oral *in vivo* e *in vitro* en perros domésticos. Se utilizaron 15 perros domésticos, que se dividieron en tres grupos iguales (n=5 por grupo) a los cuales se les asignaron tres tratamientos. El primero consistió en un producto que contiene clorhexidina al 2% y *Aloe vera* al 20% además de goma de Xantana al 1% diluido en agua destilada. El segundo y tercer tratamiento consistió en dos productos comerciales que contenían clorhexidina al 2%. Se llevaron a cabo dos etapas en el análisis microbiológico, en la etapa *in vivo*, se compararon la carga bacteriana de manera previa y posterior a la aplicación de los tratamientos. En la etapa *in vitro*, los tres tratamientos se compararon contra un control positivo de Clorhexidina al 20%. En el conteo de colonias realizado, se determinó que el producto evaluado que contiene *Aloe vera* después del tratamiento *in vivo*, el número de colonias se redujo significativamente ($F=6.18$, $p=0.03$) a diferencia de los productos que no contienen *Aloe vera* (Clorhexin y Holliday) ($F=0.868$, $p=0.3$; $F=3.66$, $p=0.09$). En la prueba de antibiograma los resultados obtenidos no demostraron diferencia significativa en el radio de inhibición de crecimiento microbiano de la prueba *in vitro* entre el producto que contenía *Aloe vera* ($\mu=1.82$ cm, 0.18 DE) y el producto Holliday ($\mu=1.65$ CM, 0.16 DE), contrario al control ($\mu=3.04$ cm, 0.38 DE) ($p= 0.02$). Con base en los resultados obtenidos, se concluye que la clorhexidina al 2% combinada con jugo de *Aloe vera*, disminuye la carga bacteriana y los grupos de bacterias en la cavidad oral de perros domésticos. Además, la inhibición que produce en cultivos bacterianos *in vitro* es la misma que el de otros compuestos que no contienen *Aloe vera*.

Palabras clave: Higiene Oral, Periodontal, Mascotas, Resistencia Bacteriana

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo general.	2
Objetivos específicos.....	2
Hipótesis.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 La presencia de <i>Canis familiaris</i> en la sociedad.....	4
2.2 Anatomía de la cavidad bucal del perro doméstico	4
2.2.1 Cavidad oral.....	4
Mucosa oral	5
2.2.3 Lengua.	6
2.2.4 Periodonto.....	6
2.3 Importancia de la salud bucal en perros domésticos.....	6
2.4 Principales enfermedades bucales que afectan al perro doméstico.....	7
2.4.1 Abrasión	7
2.4.2 Placa dentobacteriana	8
2.4.3 Estomatitis canina.....	8
2.4.4 Sarro.	8
2.4.5 Caries.	9
2.4.6 Gingivitis.	9
2.4.7 Periodontitis.	9
2.5 Bacterias causantes de enfermedades bucales en perros domésticos	10
Clase	11
Clasificación Gram.....	11
2.5.1 Actinobacteria	12
2.5.2 Firmicutes.....	12
2.5.3 Bacteroidetes	13

2.5.4 Chlorobi	13
2.5.5 Fusobacteria	14
2.5.6 Proteobacteria	14
2.5.7 Tenericutes	14
2.5.8 Spirochaetes.....	15
2.5.9 Synergistetes.....	15
2.6 Nichos orales en perros.....	15
2.7 Principales tratamientos utilizados en higiene bucal en perros.....	16
2.7.1 Limpieza dental.....	16
2.7.2 Raspado y alisado.....	17
2.7.3 Pulido.	18
2.7.4 Cepillado.....	18
2.7.5 Cuidado preventivo.	18
2.8 Clorhexidina.....	18
2.9 <i>Aloe vera</i>	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Diseño del estudio.....	21
3.2 Animales y toma de muestras.....	21
3.3 Análisis microbiológico	22
3.4 Preparación de medios	22
3.4.1 Caldo nutritivo.....	22
3.4.2 Agar sangre 8%.....	22
3.4.3 Agar Mueller-Hinton.....	23
3.5 Estudio <i>In vivo</i>	23
3.5.1 Conteo de colonias	23
3.5.2 Tinción de Gram	23
3.6 Estudio <i>In vitro</i>	24
3.7 Análisis estadístico.....	24
IV. RESULTADOS	25
4.1 Recuento de colonias	25
4.2 Antibiograma	25
4.3 Tinción Gram	26

V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIÓN	31
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales filos bacterianos pertenecientes a nichos en las cavidades bucales de perros domésticos.....	11
Cuadro 2. Comparación de tres productos respecto al crecimiento del número de colonias bacterianas de origen oral <i>in vivo</i> , antes y después del tratamiento de cada producto.....	25
Cuadro 3. Comparativa de tinciones Gram de un producto (Waupísimo) de higiene dental a base de clorhexidina al 2% con <i>Aloe vera</i> y dos productos (Clorexhin y Holliday) de higiene dental a base de clorhexidina al 2%.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales filos bacterianos pertenecientes a nichos en las cavidades bucales de perros domésticos.....	17
Figura 2. Radio de inhibición (cm) de crecimiento microbiano <i>in vitro</i> de los diferentes productos evaluados. Literales distintas significan diferencia significativa (prueba Tukey $p= 0.02$).....	26
Figura 3. Tinción de Gram observada por microscopía óptica 100x. A) Cocos Gram negativos; B) Bacilos en cadena y bacilos cortos Gram negativos; C) Bacilos cortos Gram negativos; D) Cocobacilos Gram negativos; E) Cocos Gram negativos.....	27

I. INTRODUCCIÓN

El perro doméstico (*Canis familiaris*) ha sido esencial en las sociedades humanas, se podría afirmar que, donde quiera que haya humanos, hay perros (Kaminski, 2021). Una de las enfermedades que más afectan a esta especie es la enfermedad periodontal, pero es usualmente pasada por alto debido a la ausencia de cultura de la prevención de los propietarios. Se estima que, en perros mayores de tres años, hay una prevalencia del 80-89% el cual aumenta con el paso del tiempo (Enlund *et al.*, 2020).

Las enfermedades periodontales, que se producen por una alta carga bacteriana, pueden provocar una inflamación aguda que puede convertirse en crónica produciendo enfermedades sistémicas que afectan al resto del individuo (Kangas, 2017). Esta enfermedad se presenta de forma escalonada: primero, se forma una placa bacteriana que se desarrolla en gingivitis, si esto no se corrige, se origina periodontitis. El desarrollo de estas alteraciones, la distribución y el curso dependen de la respuesta inmune del huésped (Mehrotra y Singh, 2022), es por ello que la mejor forma de actuar ante estas enfermedades es la prevención (Cunha *et al.*, 2022).

Para poder actuar a tiempo, existen tratamientos preventivos que regularmente están formulados a base de clorhexidina en concentraciones del 2%. Este antiséptico tiene un efecto bacteriostático a bajas concentraciones (0.02-0.06%) , este efecto lo logra mediante un desequilibrio iónico desplazando el calcio y el magnesio además de la pérdida de potasio de la pared celular. Si las concentraciones se elevan (>0.1%), se provoca la lisis celular debido a la fuga de los componentes celulares a través de la membrana (Brookes *et al.*, 2020).

Por otro lado, desde hace algunas décadas se ha conocido acerca del incremento en la resistencia antibiótica, y, de manera reciente, se ha descubierto que la generación de resistencia a antisépticos se encuentra ligada a la sobreestimulación de mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos (Früh *et al.*, 2022). Debido a esto, se ha puesto mayor esfuerzo en la búsqueda de compuestos de origen natural que puedan incrementar la efectividad de los antisépticos como la clorhexidina. Uno de estos compuestos es el *Aloe vera*. Esta planta no nativa tiene una amplia distribución geográfica con buen potencial para desarrollarse en zonas áridas (Manvitha *et al.*, 2014). Además, tiene propiedades terapéuticas que le permiten actuar como un antimicrobiano, antitumoral, antiinflamatorio e inmunoestimulante (Salehi *et al.*, 2018). Estas capacidades están brindadas por su contenido de antraquinonas, carbohidratos, enzimas, vitaminas y aminoácidos que le permiten actuar como un antiinflamatorio, antiséptico y antitumoral (Sangur *et al.*, 2016).

Considerando a la prevención como la mejor alternativa a esta condición, y bajo los antecedentes expuestos, el objetivo de este trabajo es la evaluación de la eficiencia de clorhexidina enriquecida con *Aloe vera* como un método de prevención de las enfermedades periodontales en perros domésticos

Objetivo general.

Evaluar la combinación de clorhexidina con *Aloe vera* sobre la disminución de la carga bacteriana oral *in vivo* e *in vitro* en perros domésticos.

Objetivos específicos.

- Determinar la eficiencia de la combinación de clorhexidina al 2% con *Aloe vera* contra dos productos comerciales de clorhexidina al 2%, sobre la disminución de la carga bacteriana bucal.

- Determinar la carga bacteriana mediante conteo de colonias bacterianas posterior al uso de clorhexidina al 2% con *Aloe vera* y dos productos que contengan únicamente clorhexidina al 2%

Hipótesis

La combinación de clorhexidina al 2% con *Aloe vera* es mas eficiente para el tratamiento preventivo de enfermedades periodontales en perros domésticos que aquellos que solo tienen en su fórmula clorhexidina al 2%.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La presencia de *Canis familiaris* en la sociedad

Canis familiaris fue la primera especie en ser domesticada por el hombre hace aproximadamente 20,000 años, periodo en el cual, estos animales pasaron de ser depredadores a miembros de las sociedades humanas alrededor del mundo; donde quiera que haya humanos, hay perros (Kaminski, 2021). Esta especie forma parte fundamental de la familia occidental donde se integran a las actividades diarias de las mismas, su presencia atrae sentimientos positivos, pero también, afectan las dinámicas emocionales de manera negativa cuando cursan por enfermedades (Díaz-Videla y Rodríguez-Ceberio, 2019).

En 2021, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) comunicó a través de su primera Encuesta Nacional de Bienestar Autorreportado (ENBIARE), que, a nivel hogares, un 69.8% de los mexicanos cuenta con algún tipo de mascota, siendo este porcentaje un acumulado de 80 millones de animales domésticos, donde 43.8 millones son caninos, 16.2 millones son felinos y 20 millones pertenecen a variedades pequeñas no tan convencionales (INEGI, 2021). En estas estadísticas, no se incluyen los que se encuentran en situaciones de abandono y en estado feral, donde sus números podrían considerarse completamente desconocidos.

2.2 Anatomía de la cavidad bucal del perro doméstico

2.2.1 Cavidad oral

La cavidad oral comprende el área extendida desde los labios hasta la faringe oral, está limitado por los labios rostralmente y por las mejillas de manera lateral. Se subdivide en dos partes, el vestíbulo y la cavidad bucal propiamente dicha, donde se encuentran estructuras como el paladar suave, paladar duro, la lengua y el piso

de la boca (Lemmons y Beebe, 2019). El nivel de higiene en la cavidad oral se relaciona con la condición del microbioma, se encuentra sumida en una variedad de fluidos compuestos principalmente por saliva y líquido crevicular gingival, los cuales juegan un rol importante en el mantenimiento de la salud bucal (Kane, 2017).

Mucosa oral

Esta, se extiende desde los márgenes de los labios hasta el área de las amígdalas recubriendo la cavidad bucal, estas membranas se encuentran divididas en tres categorías: La mucosa especializada, la mucosa masticatoria y la mucosa de revestimiento (Lemmons y Beebe, 2019).

I. Mucosa especializada.

Se localiza en la lengua y los dientes, presenta papilas linguales y los corpúsculos gustativos (Lemmons y Beebe, 2019). Está compuesta por numerosas papilas que se presentan como estructuras cónicas, tienen un núcleo y lámina propia recubierta por epitelio queratinizado (Kempf *et al.*, 2017).

II. Mucosa masticatoria.

Se encuentra en la encía y en el paladar duro, puede presentar gránulos de queratina, se adhiere con firmeza a los planos profundos (Lemmons y Beebe, 2019). El tipo de epitelio del que consta esta membrana es un epitelio escamoso estratificado queratinizado o paraqueratinizado, dándole la fuerza y capacidad para resistir los procesos de masticación (Brizuela y Winters, 2022).

III. Mucosa limitante.

Se encuentra en los labios, carrillos, piso de la boca, superficie inferior de la lengua y paladar blando, es delgada con epitelio no queratinizado (Saavedra y Hernández, 2014). Su función es actuar como un revestimiento, se le conoce también como mucosa móvil (Brizuela y Winters, 2022).

2.2.3 Lengua.

Es una estructura muscular móvil ubicada en la cavidad oral, sus funciones son el aseo de la cavidad y participar en la ingesta de alimentos y fluidos, sus papilas son las responsables de la detección de sabores (Lemmons y Beebe, 2019). Entre sus funciones podemos encontrar en *Canis familiaris* la disipación de calor, en su superficie dorsal se encuentra ricamente irrigada y repleta de glándulas salivales que participan en esta función (Buelow *et al.*, 2011).

2.2.4 Periodonto

Son el conjunto de tejidos que se encargan del apoyo, protección y nutrición de los dientes, está conformado por la encía, los ligamentos y el hueso alrededor de los dientes (Cope y Cope, 2011). Los tejidos gingivales proporcionan un marco de defensa corporal en la periferia del diente, proporcionando así un sello que resiste las fuerzas de fricción de la masticación, defiende el espacio interdental y a los tejidos blandos de objetos y microorganismos (Soi *et al.*, 2018). El ligamento periodontal es un tejido blando que se encuentra altamente vascularizado, rodea las raíces de los dientes y su función se centra en la distribución de las fuerzas generadas durante la función masticatoria, es esencial para el movimiento de los dientes, la cual estará determinada en buena medida por el espesor, la altura y la calidad de este ligamento (Lindhe y Lang, 2017).

2.3 Importancia de la salud bucal en perros domésticos

Las enfermedades dentales son una de las afecciones más relevantes en perros domésticos. En el caso de las afecciones periodontales, se considera una prevalencia del 80-89% en perros con más de tres años de edad. Durante este tipo de patologías, se presenta inflamación de los tejidos que soportan los dientes, estas

afecciones se dirigen de manera progresiva a la degeneración de la encía y pérdida del diente (Enlund *et al.*, 2020).

Las enfermedades periodontales son poco diagnosticadas en medicina veterinaria, la Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales (WSAVA) considera a este tipo de enfermedades como sub tratadas e incluso ignoradas, por lo cual no tienden a aplicarse tratamientos, representando una preocupación importante para el bienestar animal (Niemiec *et al.*, 2020).

Con la omisión de tratamientos, las enfermedades que se presentan en la cavidad bucal pueden provocar dolores agudos, contribuir en la aparición de enfermedades locales y sistémicas (Finch *et al.*, 2016). Además de los efectos mencionados, estas patologías se encuentran asociadas con enfermedades que afectan a riñones, corazón e hígado, pueden tener a su vez consecuencias incluso mortales por inanición y septicemias (O'Neill *et al.*, 2021).

2.4 Principales enfermedades bucales que afectan al perro doméstico

En esencia todas las enfermedades dentales derivarán en periodontitis, los pasos ocurren de manera escalonada y todos son prevenibles y reversibles hasta que se llega hasta ese punto.

2.4.1 Abrasión

Es un desgaste dental atribuible a daños mecánicos por masticación, se considera crónicamente persistente a menos que se logre identificar el objeto causante y se retire, su tratamiento dependerá del nivel de daño y desgaste en el diente (Thorne, 2018).

2.4.2 Placa dentobacteriana

Está compuesta principalmente por bacterias, es una capa que cubre los dientes cuando estos no son cepillados, su adhesión se ve facilitada por la presencia de cálculos dentales, también llamados sarro (Olsén *et al.*, 2021). La placa dental, si no es removida de manera frecuente, puede desarrollarse entre el diente y la encía, haciéndola más difícil de remover y de tratar con quimioterapéuticos dado a su acumulación en sitios difíciles de alcanzar y penetrar (Berger *et al.*, 2018).

2.4.3 Estomatitis canina

Es un desorden crónico y debilitante de la mucosa oral, su patogénesis no se encuentra del todo dilucidada, pero se cuenta con una hipótesis común sobre la responsabilidad que tiene la placa bacteriana en las superficies dentales en las lesiones ulcerativas de la mucosa (Anderson *et al.*, 2021). Además de la generación de úlceras en cavidad oral, puede provocar en muchas ocasiones inflamación y necrosis de la mucosa, los perros que la presentan sufren de inanición y pérdida de peso producto del dolor que se produce al comer (Anderson *et al.*, 2017).

2.4.4 Sarro.

Son formas mineralizadas de la placa dental, también llamados cálculos dentales, facilitan la adhesión de esta última sobre la superficie de los dientes (Olsén *et al.*, 2021). Es principalmente irritante y no es patogénico por sí mismo, aun así, su remoción es esencial, debido a que funciona como una matriz de retención para placa y toxinas dañinas para los dientes y sus tejidos de apoyo (Bellows *et al.*, 2019). En perros, la formación de los cálculos dentales se considera normal desde el primer año de vida, se presentan como masas amarillas-cafés en la superficie bucal (Borah *et al.*, 2014) se consideran la principal causa en el desarrollo de la enfermedad periodontal (Bringel *et al.*, 2020).

2.4.5 Caries.

Son una enfermedad infecciosa producto de la acción fermentativa de bacterias específicas, estas provocan un deterioro de la placa dentaria (Basso, 2019). Los principales microorganismos que provocan este tipo de daños son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, los cuales se han encontrado como habitantes usuales del medio bucal, expresan patogenicidad bajo factores específicos (Bowden, 2000), los productos generados por el metabolismo de estos dos microorganismos generan los medios adecuados para el crecimiento de otras bacterias, como *Lactobacillus* sp., las cuales participan en la formación de caries y llegan a cavidades a raíz de alimentos lácteos (Vasudevan, 2017). El ácido láctico generado degrada los dientes, si el daño perdura, se presentarán afecciones a nivel pulpa, donde el proceso será irreversible y los microorganismos podrán acceder a nervios y vía sanguínea, donde podrían diseminarse y afectar de manera sistemática, se encuentran relacionadas a procesos de endocarditis infecciosas (Bumm y Folwaczny, 2021).

2.4.6 Gingivitis.

Se considera la primera etapa de la enfermedad periodontal, este proceso es reversible, no es un proceso destructivo, sino uno inflamatorio de la encía (Alawadh, 2022). En su etiología, se encuentran especies como *Streptococcus* spp, *Fusobacterium* spp, *Actinomyces* spp, *Veillonella* spp y *Treponema* spp; la gingivitis puede tener origen bacteriano, nutricional, hormonal y endógeno mediante el uso de drogas como inhibidores de canales de calcio, anticoagulantes, vitamina A y sus análogos (Rathee y Jain, 2022).

2.4.7 Periodontitis.

Es la segunda etapa de la enfermedad periodontal, es irreversible pero controlable, durante ella, los tejidos que soportan al diente presentan inflamación y posterior

pérdida de inserción debido a la destrucción del ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar (Wallis y Holcombe, 2020). Esta enfermedad es de tipo disbiótica, con un cambio del número relativo de componentes individuales de la comunidad bacteriana, el cambio de bacterias Gram positivas subgingivales a Gram negativas, tiene una etiología multifactorial (Kačirová *et al.*, 2022).

2.5 Bacterias causantes de enfermedades bucales en perros domésticos

Las bacterias son microorganismos que se encuentran en abundancia alrededor de la tierra, corresponden a los organismos vivos más longevos y estructuralmente simples (Al-Mohanna y Quine, 2016). Sus características generales se definen en la organización celular procariota donde se presenta un nucleoide o cuerpo celular, hay carencia de organelos citoplasmáticos con unión a la membrana y su multiplicación se presenta por fisión binaria (Whitman, 2009). Se encuentran clasificados de manera simple por su morfología en cocos (forma esférica), bacilos (forma de varilla), vibrios (forma de coma) y espirales, muchas de ellas pueden ser pleomórficas y no contar con formas características (Willey *et al.*, 2020).

De las metodologías que nos permiten realizar la identificación por medio de su morfología se encuentra la tinción de Gram, una técnica introducida en 1882 que continúa siendo una de los procedimientos más cruciales en la microbiología (Tripathi y Sapra, 2022), se basa en el desempeño de la pared bacteriana para lograr retener ciertos colorantes, brindando la clasificación de Gram positivas a aquellas que logran retener el colorante cristal violeta y Gram negativas a aquellas que retienen el colorante safranina (Silhavy *et al.*, 2010; Tripathi y Sapra, 2022).

Las bacterias Gram negativas anaerobias prevalecen en las superficies supragingivales y subgingivales en perros que presentan placa dental y cursan por enfermedades periodontales (Özavci *et al.*, 2019). Es importante resaltar que tanto Gram positivas como Gram negativas tienen la capacidad de producir respuestas inflamatorias y debe de considerarse que la cavidad oral presenta toda una gran

diversidad de nichos bacterianos, los cuales conforman un ambiente único (Ruparell *et al.*, 2020). Bajo ciertas circunstancias el microbioma contribuye a la generación de las enfermedades periodontales, siendo las bacterias del género *Porphyromonas* las que predominan de manera usual, cómo es que esta comunidad bacteriana se ve alterada durante la enfermedad periodontal, especialmente aquellas poblaciones subdominantes, no está del todo claro (Santibáñez *et al.*, 2021).

Cuadro 1. Principales filos bacterianos pertenecientes a nichos en las cavidades bucales de perros domésticos (Ruparell *et al.*, 2020)

Clase	Clasificación Gram
Actinobacteria	+
Bacteroidetes	-
Chlorobi	-
Firmicutes	+
Fusobacteria	-
Gracillibacteria	-
Proteobacteria	-
Tenericutes	-
Spirochaetaes	-
Synergistetes	-

2.5.1 Actinobacteria

Este grupo corresponde al filo más abundante de bacterias en ecosistemas terrestres y acuáticos (incluidos medios marinos), son Gram positivas de características filamentosas que cuentan con la capacidad de crear estructuras similares a los micelios (Barka *et al.*, 2016). Este género ha sido relevante para la obtención de bioactivos a través de especies como *Streptomyces* spp., pero también contiene especies de interés veterinario como las pertenecientes al orden de las Nocardias (Xie y Pathom-aree, 2021).

2.5.2 Firmicutes

Los firmicutes es un filo bacteriano de amplia distribución que se encuentra dividido en tres clases: *Bacili*, *Clostridia* y *Erysipelotrichia*, generalmente se reconocen como Gram positivas y tienen efectos negativos en la salud humana y animal (Nahar *et al.*, 2018). Dentro de la clase *Bacili* se encuentran bacterias de interés debido a su potencial patógeno, como las pertenecientes las familias *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae* y *Listeriaceae*; en el caso de la clase *Clostridia* se encuentran los clostridiales, siendo la familia más reconocida la *Clostridiaceae* al albergar especies como *C. tetani*, *C. botulinum* y *C. perfringens* (Galperin, 2015).

2.5.3 Bacteroidetes

Son un filo de bacterias Gram negativas que, junto con el filo de los firmicutes, domina la microbiota intestinal de la mayoría de los seres vivos (Wexler y Goodman, 2017). Dentro de este filo se encuentran tres clases: *Prevotella*, *Bacteroides* y *Porphyromonas*, siendo esta última una de las clases con mayor importancia e impacto en la salud bucal de diversos individuos (Johnson *et al.*, 2017). Las especies dentro de este género son capaces de invadir y dañar el epitelio de la mucosa oral, así como de inducir respuestas inflamatorias que deriven en destrucción del periodonto y la pérdida de piezas dentales (do Nascimento Silva *et al.*, 2017). Se trata de bacterias Gram negativas, anaerobias obligatorias, no formadoras de esporas y no motiles (Guilloux *et al.*, 2021). Dentro de este género, destaca *Porphyromonas gulae*, el patógeno periodontal más importante en perros, el cual puede ser transmitido a sus propietarios (Nomura *et al.*, 2020) y *Porphyromonas gingivalis*, el cual se ha comprobado que tiene una relación con el desarrollo de una gran cantidad de enfermedades sistémicas como la aterosclerosis, cáncer e incluso Alzheimer, esto debido a su notable capacidad para sobrevivir en otros tejidos diferentes a los presentes en la cavidad oral (Mei *et al.*, 2020).

2.5.4 Chlorobi

Este filo bacteriano se caracteriza principalmente por contener bacterias verdes del azufre (GSB, por sus siglas e inglés) y abarca algunas bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas (Camanocho y Dewhirst, 2014). Dos de sus taxones se han encontrado de manera general en la cavidad bucal de mamíferos, siendo más comunes en la cavidad oral de perros, se desconoce de manera específica la especie presente debido a sus cualidades de no cultivables (Dewhirst *et al.*, 2012).

2.5.5 Fusobacteria

Fusobacteria es un filo bacteriano comprendido por bacilos anaerobios de tipo Gram negativo, tienen reservorios específicos dentro de la cavidad bucal y tracto gastrointestinal entre otros en seres humanos y diversas especies animales (Brennan y Garret, 2019). Las especies dentro de este filo forman parte primordial de la formación de biofilms en la superficie dental, por sí mismas, estas no participan en su segregación pero si en su maduración (Thurnheer *et al.*, 2019).

2.5.6 Proteobacteria

El filo proteobacteria comprende el más abundante de todos, sus miembros se caracterizan por ser Gram negativos, juegan un papel importante en diversos ecosistemas perteneciendo a nichos animales, saprófitos, acuáticos y vegetales, son facultativos o anaerobios obligados (Moon *et al.*, 2018). Dentro de este grupo se encuentran microorganismos que permiten mantener el balance de la microbiota en el sistema digestivo, pero también microorganismos que podrían causar disbiosis y desórdenes inflamatorios, como *E. coli*, *Campylobacter* y *Helicobacter* (Garrigues *et al.*, 2022).

2.5.7 Tenericutes

El filo Tenericutes comprende bacterias que no cuentan con pared celular de peptidoglucanos, aquí se contienen familias como las de los *Mycoplasmas*, *Ureaplasma* y *Acholeplasma*, los cuales se han reconocido como comensales de diversas microbiotas en animales y humanos, y como potenciales patógenos ante problemas de supresión inmunitaria o disbiosis (Wang *et al.*, 2020). Los *Mycoplasmas* son considerados como parte de la microbiota normal de las vías respiratorias superiores en perros y representan un riesgo para las vías inferiores, esta especie es susceptible a diversos tipos de micoplasmas, pero no todos logran causar enfermedad (Hussein y Hamad, 2022).

2.5.8 Spirochaetes

Filo bacteriano que comprende bacterias con morfología característica de espiral (ondulados) y cuentan con endoflagelos periplásmicos, algunas de las especies pertenecientes a este filo son consideradas como patógenas, siendo *Listeria* spp. la de mayor relevancia clínica (Nakamura, 2020). Estas bacterias se encuentran en fondos marinos, suelos, como comensales intestinales de artrópodos y como parásitos obligados en vertebrados, tienen capacidad anaerobia y aerobia y pueden ser de vida libre o asociados al huésped (Gupta *et al*, 2013).

2.5.9 Synergistetes

Las bacterias pertenecientes a este filo son Gram negativas, anaerobias estrictas, son no formadoras de esporas con una forma de bastones o de vibrios (Jumas-Bilak y Marchandin, 2014). Las especies que pertenecen a este filo son encontradas usualmente en las enfermedades periodontales humanas pero su estudio se ha visto dificultado debido a que solo algunas de las clases bacterianas del filo pueden ser cultivadas (Vartoukian *et al.*, 2009).

2.6 Nichos orales en perros

Los nichos orales en perros pueden distinguirse en tres grupos base, los de la superficie de tejido duro, donde encontramos la placa supragingival, los de la superficie de tejido blando, que comprenden la mucosa bucal y el dorso de la lengua, y los de la saliva, donde encontramos diferentes taxones y perfiles microbianos (Figura 1) (Ruparell *et al.*, 2020).

2.7 Principales tratamientos utilizados en higiene bucal en perros

En medicina veterinaria, se han elaborado diversos manuales para el cuidado dental de caninos y felinos, los cuales convergen en las siguientes actividades y recomendaciones (Lamster y Pagan, 2017; Bellows *et al.*, 2019; Niemiec *et al.*, 2020):

2.7.1 Limpieza dental.

Se definen los puntos donde se encuentran las mayores concentraciones de placa dental y sarro, se remueve la biomasa encontrada en dientes y en las zonas interproximales que estén en contacto con las encías. Se recomienda el uso de sustancias reveladoras de biofilm para observar de manera concreta estos espacios. Este proceso funciona como tratamiento de la gingivitis y previene la progresión a periodontitis.

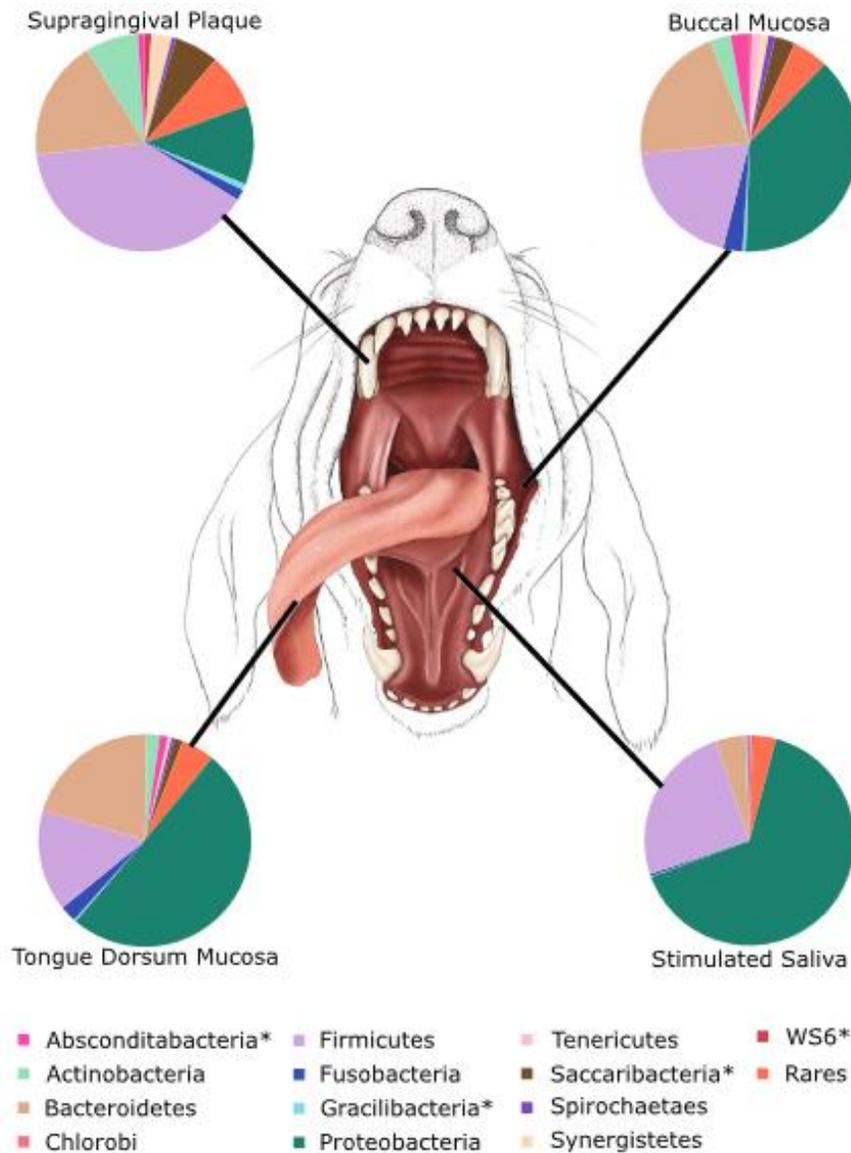


Figura 1. Principales clases bacterianas pertenecientes a nichos en las cavidades bucales de perros domésticos (Tomado de Ruparell *et al.*, 2020).

2.7.2 Raspado y alisado.

Se logra mediante el uso de raspadores y curetas, el procedimiento consiste en raspar por debajo de las encías y alisar las áreas subgingivales eliminando así el sarro que pudiera estar acumulado.

2.7.3 Pulido.

Se hace uso de frases con cerdas y pastas de pulido con diferentes sabores y granulaciones, se realiza a bajas revoluciones y en refrigeración evitando así excesos y daños profundos, dejando una superficie pulida y satinada.

2.7.4 Cepillado.

Es un procedimiento mecánico que se lleva a cabo preferentemente después de la ingestión de alimentos, puede llevarse a cabo con cepillos, gasas y dediles. Es importante resaltar que este procedimiento remueve placa, pero no cálculos dentales (sarro).

2.7.5 Cuidado preventivo.

Se encuentra centrado en el cuidado en el hogar, donde los dueños de la mascota deberán de llevar a cabo revisiones constantes de la salud bucal de su mascota. En esta etapa, se recomiendan los cepillados como la acción mecánica de preferencia para la eliminación de biofilms formados por la placa bacteriana. Cuando el biofilms es retirado, las fórmulas como sprays orales, enjuagues y aditivos en agua.

Estos procesos deben de ser realizados únicamente por profesionales veterinarios que cuenten con los conocimientos y herramientas adecuados para llevar a cabo todo el proceso. Se recomienda tomar medidas preventivas para evitar llegar a estos procesos.

2.8 Clorhexidina.

Es una biguanida utilizada como un antiséptico de amplio espectro desarrollado en 1940 y cuya actividad antiplaca fue descubierta en 1970 (Poppolo Deus y Ouanounou, 2022). Tiene buen desempeño contra agentes Gram positivos y negativos, incluyendo *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. mascescens* así como anaerobios facultativos (Dramowski *et al.*, 2021), Los productos de clorhexidina son utilizados de manera terapéutica y profiláctica gracias a sus propiedades

antimicrobianas y antifúngicas incluso a bajas concentraciones, esta sustancia puede incluso destruir el ADN y ARN de virus, así como inactivar virus envueltos (Poppolo Deus y Ouanounou, 2021). Su actividad bactericida se presenta en bajas concentraciones mediante una alteración del balance osmótico en la bacteria, a altas concentraciones la actividad bactericida se presenta debido a procesos de citólisis al incrementar la permeabilidad de la membrana celular (Al-Eraky *et al.*, 2016).

Este antiséptico es relativamente inefectivo en presencia de sangre, pus y tejido necrosado, en medicina veterinaria, se han utilizado en la limpieza de heridas, piel, instrumental y equipos, así como en el caso de inflamaciones gingivales y enfermedades periodontales (Odermatt *et al.*, 2016).

2.9 Aloe vera

Es una planta compuesta por raíz, tallo, hojas y flores dependiendo de la época del año, comprende alrededor de 360 especies diferentes y su tamaño puede alcanzar hasta los 50 cm (Domíguez-Fernández *et al.*, 2012). Cuenta con una amplia distribución geográfica, siendo nativa del norte de África y España, puede sobrevivir más de siete años sin recibir agua, por lo cual se ha hecho posible encontrarla en zonas desérticas de Asia, Europa y América (Manvitha *et al.*, 2014). Los extractos de *Aloe vera* son bastante comunes en comida, cosméticos y medicina, contienen altas concentraciones de polisacáridos a los que se les han atribuido diferentes usos terapéuticos (Jales *et al.*, 2022). Se han informado múltiples propiedades biológicas entre las que se incluyen la actividad antimicrobiana, antibacteriana, antitumoral, antiinflamatoria, anti artríticas, anti reumatoide, anti cancerígena, desintoxicante, promotor de la digestión e inmunoestimulante (Negash y Mohammed, 2016).

El jugo de *Aloe vera* es obtenido mediante su molienda o maceración de la hoja, seguido de un proceso de purificación para eliminar los compuestos fenólicos que puedan considerarse indeseables (Pressman *et al.*, 2019). Este jugo es útil en el

tratamiento de enfermedades hepáticas y afecciones dermatológicas, además, presenta cualidades sanadoras en las encías favoreciendo la eliminación de enfermedades periodontales, mucositis y abrasiones (Manvitha *et al.*, 2014). En años recientes se ha introducido como un tratamiento de diversas condiciones orales y dentales, incluida la fibrosis de la submucosa oral, estomatitis aftosa, periodontitis y gingivitis, sin provocar efectos secundarios (Figueiredo *et al.*, 2022).

Aloe vera contiene más de 75 compuestos donde se incluyen vitaminas, enzimas, minerales, carbohidratos, antraquinonas, ácidos grasos, hormonas y otros compuestos varios como ácido salicílico, lignina y saponinas (Sánchez *et al.*, 2020). Entre sus agentes antisépticos se encuentra el Lupeol, ácido salicílico, nitrógeno ureico, ácido caninámico, fenoles y azufre, lo cual le permite inhibir la actividad de bacterias, hongos y virus (Surjushe *et al.*, 2008). Sus capacidades antisépticas y antiinflamatorias lo vuelven un componente ideal para el desarrollo de productos dentales, ya que pueden fácilmente reducir la inflamación en casos de gingivitis previniendo su evolución a las últimas etapas de la enfermedad periodontal, además, debido a que la planta y sus productos no contienen sustancias abrasivas a diferencia de otros productos dentales para humano y uso animal representan una alternativa viable no solo para la disminución de las cargas bacterianas si no también para la protección y el cuidado de dentaduras sensibles (Sujatha *et al.*, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio completamente al azar en la región de La Comarca Lagunera, México. Se utilizaron 15 perros domésticos, los cuales se dividieron en tres grupos iguales, a los cuales se les asignaron tres tratamientos. El primero, fue el grupo tratado y se asignó el término de: “Waupísimo” (n=5), que consistió en la combinación de clorhexidina al 2% y *Aloe vera* al 20% además de goma de Xantana al 1% (añadido para darle palatabilidad) diluido en agua destilada. Dado que se pretende comparar con los productos comerciales, se utilizaron dos grupos control para disminuir el sesgo del fabricante. El grupo control 1 denominado “Clorhexín” (n=5), consistió en un producto que contenía clorhexidina al 2%. De igual manera, el grupo control 2, denominado “Holliday” (n=5) contenía clorhexidina al 2%.

El estudio se realizó en dos etapas, una *in vivo* y otra *in vitro*. En la primera etapa, se tomaron muestras de cavidad bucal para estudio bacteriológico antes y después de la aplicación de los tratamientos. Para la etapa *in vitro*, se utilizaron los mismos tratamientos excepto el grupo “Clorexhin”, el cual se cambió por Clorhexidina al 20 % que también sirvió como control, esto, como testigo principal en estudios que se realizan *in vitro*.

3.2 Animales y toma de muestras

Se eligieron 15 animales adultos que tuvieran presencia de placa bacteriana diagnosticados por un Médico Veterinario experto. Las muestras consistieron en hisopados bucales, los cuales fueron obtenidos procurando la zona de las encías y las mejillas, frotando la zona con el hisopo estéril durante 15 segundos. Se utilizaron medios de transporte Stuart para conservar el material obtenido, y posteriormente,

ser llevados a la unidad de diagnóstico veterinario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, donde se procedieron a realizar pruebas microbiológicas, el mismo procedimiento se realizó 10 días después.

3.3 Análisis microbiológico

Se llevaron a cabo dos etapas en el análisis microbiológico, en la etapa *in vivo*, las muestras analizadas consistieron en comparaciones de carga bacteriana de manera previa y posterior a la aplicación de los tratamientos. En la etapa *in vitro*, los tres tratamientos se compararon contra un control positivo de Clorhexidina al 20%.

3.4 Preparación de medios

3.4.1 Caldo nutritivo

El medio se preparó de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se vaciaron 10 ml de medio en 15 tubos de vidrio de 16x150 mm con tapa de rosca que fueron llevados posteriormente a esterilizarse a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos a 14 libras de presión. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente transcurrido ese tiempo, fueron sellados con cinta de cera alrededor de la tapa de rosca y refrigerados a 8 °C hasta el día de su uso.

3.4.2 Agar sangre 8%

La base del medio se preparó de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se llevó a esterilizar a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos a 14 libras de presión. La sangre correspondiente al 8% del volumen preparado se agregó dentro del medio estéril cuando este alcanzó una temperatura cercana al ambiente y se agitó de manera vigorosa, posteriormente fue vaciado en cajas Petri de vidrio estériles y dejado enfriar a temperatura ambiente. El contorno de las cajas fue

sellado con cinta de cera, las cajas se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

3.4.3 Agar Mueller-Hinton

Se preparó el medio de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se llevó a esterilizar a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos a 14 libras de presión. El contorno de las cajas fue sellado con cinta de cera, las cajas se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

3.5 Estudio *In vivo*

Para disminuir la carga bacteriana, la muestra se diluyó mediante inmersión del hisopo durante 5 segundos en una solución de 10 ml de caldo nutritivo. Posteriormente, el tubo se homogenizó. De esta solución, se tomó una alícuota de 100 µl que se inocularon en placas de agar sangre al 8% utilizando un asa de Digrafsky para extender la alícuota alrededor del medio. Se incubaron las placas durante 24 horas a una temperatura de 37 °C. Los crecimientos obtenidos fueron cuantificados mediante el conteo de colonias e identificados mediante tinción de Gram.

3.5.1 Conteo de colonias

Se realizaron conteos de colonias a cada caja de medio obtenida, se utilizó un contador de colonias manual.

3.5.2 Tinción de Gram

De cada caja de medio obtenida se obtuvieron distintas colonias a las cuales se les realizó tinción de Gram. La selección de las colonias fue realizada mediante una

diferenciación macroscópica. Se utilizaron colorantes marca Hycel en presentación de 125 mL.

3.6 Estudio *In vitro*

Se prepararon discos de papel filtro estériles con una medida de 6 ± 0.5 mm sobre los cuales se impregnó cada uno de los productos y el control de Clorhexidina al 20 %. Los discos se colocaron en placas de Agar Müller Hinton a distancias equivalentes. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los halos de inhibición obtenidos fueron medidos en cm.

3.7 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS Ver.25. Previo a el análisis de los datos, los datos se sometieron a un análisis de normalidad con el test Kolmogorov-Smirnov. El análisis del conteo de colonias, se llevó a cabo con un análisis longitudinal antes y después de la aplicación del producto correspondiente por medio de un análisis de varianza (ANOVA) para datos relacionados. Para los resultados obtenidos en las pruebas de antibiograma se realizó un ANOVA para grupos independientes. En todas las pruebas se utilizó, como post-hoc, una prueba Tukey con una significancia del 0.05.

IV. RESULTADOS

4.1 Recuento de colonias

En el conteo de colonias realizado, se determinó que el producto evaluado que contiene *Aloe vera* después del tratamiento *in vivo*, el número de colonias se redujo significativamente ($F=6.18$, $p=0.03$) a diferencia de los productos que no contienen *Aloe vera* ni goma de Xantana al 1% diluido en agua destilada (Clorhexin y Holliday) ($F=0.868$, $p=0.3$; $F=3.66$, $p=0.09$), los cuales se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Comparación de tres productos respecto al crecimiento del número de colonias bacterianas de origen oral *in vivo*, antes y después del tratamiento de cada producto.

Producto	Antes	Después	Valor- p
Waupísimo	146.2 \pm 103.09	29.6 \pm 29.06	0.03
Clorhexin	187.8 \pm 216.81	79.4 \pm 143.75	0.3
Holliday	456.8 \pm 395.74	104.8 \pm 111.44	0.09

Los datos muestran la media \pm desviación estándar. La diferencia estadística se realizó con una prueba post-hoc Tukey con significancia de $p=0.05$

4.2 Antibiograma

En la prueba de antibiograma los resultados obtenidos no demostraron diferencia significativa en el radio de inhibición de crecimiento microbiano de la prueba *in vitro* entre el producto que contenía *Aloe vera* ($\mu=1.82$ cm, 0.18 DE) y el producto Holliday ($\mu=1.65$ CM, 0.16 DE), contrario al control ($\mu=3.04$ cm, 0.38 DE) ($p= 0.02$). Tal como se observa en la figura 2.

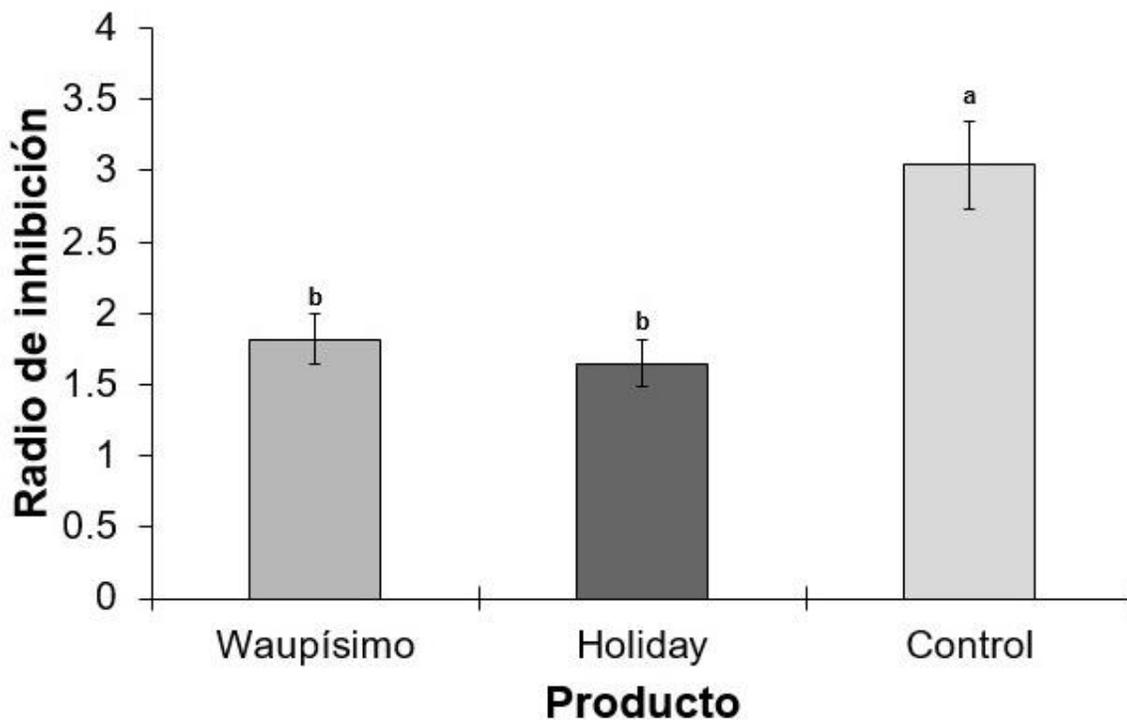


Figura 2. Radio de inhibición (cm) de crecimiento microbiano *in vitro* de los diferentes productos evaluados. Literales distintas significan diferencia significativa (prueba Tukey $p= 0.02$).

4.3 Tinción Gram

Durante la evaluación morfológica de las colonias, se observó una diferencia entre los tipos de bacterias que crecieron antes y después de los tratamientos (cuadro 3). En ellas se observaron cocos gram negativos; estreptobacilos y bacilos cortos Gram negativos; bacilos cortos y cocos gram negativos, y cocobacilos Gram negativos, entre otros (figura 3)

Cuadro 3. Comparativa de tinciones Gram de un producto (Waupísimo) de higiene dental a base de clorhexidina al 2% con *Aloe vera* y dos productos (Clorhexin y Holliday) de higiene dental a base de clorhexidina al 2%.

Grupo bacteriano	Waupísimo			Clorhexin			Holliday		
	Antes	Después	Efecto	Antes	Después	Efecto	Antes	Después	Efecto
Bacilos cortos Gram +	80%	40%	Disminuye	20%	60%	Aumenta	40%	40%	Invariable
Cocos G +	40%	80%	Aumenta	100%	100%	Invariable	20%	60%	Aumenta
Cocos G -	40%	40%	Invariable	100%	100%	Invariable	100%	20%	Disminuye
Cocobacilos G -	40%	0	Disminuye	0	0	Invariable	0	0	Invariable

Los porcentajes muestran la presencia de los grupos bacterianos en un total de cinco muestras realizadas en la evaluación de cada producto en cada etapa del experimento (antes y después). El efecto hace referencia al resultado obtenido tras la aplicación de los productos evaluados.

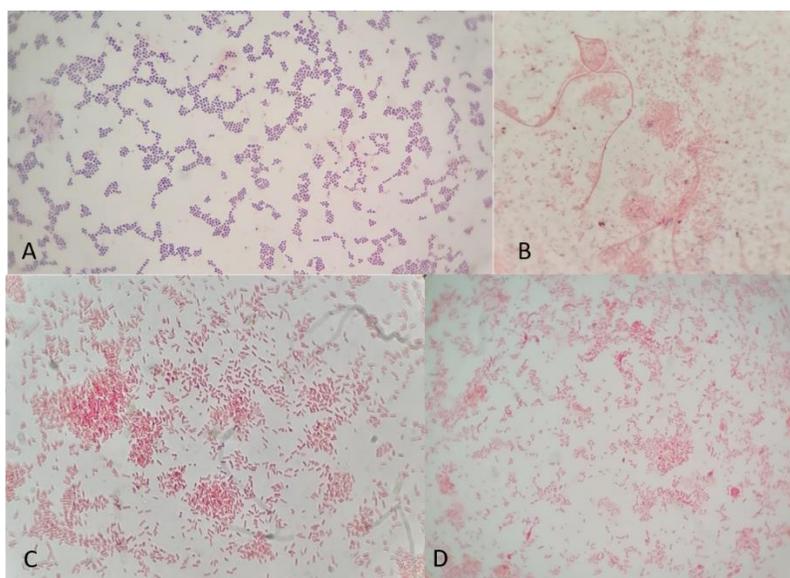


Figura 3. Tinción de Gram observada por microscopía óptica 100x. A) Cocos Gram negativos; B) Streptobacilos y bacilos cortos Gram negativos; C) Bacilos cortos y cocos Gram negativos; D) Cocobacilos Gram negativos.

V. DISCUSIÓN

Las enfermedades periodontales en perros domésticos representan una de las enfermedades con mayor impacto en la salud bucal (Anderson *et al.*, 2021). Con el creciente descubrimiento de la resistencia microbiana a antisépticos, como la clorhexidina (Cunha *et al.*, 2022), se vuelve vital la búsqueda de alternativas naturales como el *Aloe vera*. Como se demostró en los resultados de este trabajo, los productos de higiene bucal para perros domésticos con base de clorhexidina con contenido de *Aloe vera* presentan una mayor reducción de la carga bacteriana de cavidad bucal que aquellos productos que no la contienen, cumpliéndose así, la hipótesis planteada.

El crecimiento de colonias bacterianas del estudio *in vivo*, se redujo significativamente al utilizar el producto con contenido de *Aloe vera* ($p= 0.03$) respecto aquellos que no contenían aditivos provenientes de esta planta (Clorhexin y Holliday; $p=0.3$ y 0.09 respectivamente). Estos resultados son coincidentes con los estudios realizados en pastas dentales de uso humano (Nasiri *et al.*, 2021), donde se recomienda el uso del *Aloe vera* en productos de higiene dental para reducir cargas bacterianas en la cavidad bucal. Incluso, se sugiere al *Aloe vera* como un sustituto de la clorhexidina gracias a sus propiedades antisépticas y regeneradoras. Sin embargo, de acuerdo con Heng *et al.* (2018), debido a que los agentes antisépticos de esta planta no actúan de manera independiente, si no en sinergia, no se debe utilizar solo sino de manera complementaria con otras sustancias antisépticas. Aunque estos resultados son favorables, de acuerdo a la literatura (Früh *et al.*, 2022), se debieron haber obtenido menores cantidades de crecimientos microbianos. Este efecto, se atribuye al hecho que, en este estudio, se utilizó jugo de *Aloe vera*, el cual conserva en menor medida las propiedades de la planta que los extractos acuosos y de solventes (Dominguez-Fernández *et al.*, 2012). Por lo que, se sugiere realizar estudios utilizando extractos. Además, en este estudio no se evaluó el crecimiento de bacterias anaerobias estrictos como *Fusobacterium* spp y *Porphyromonas* spp, por lo tanto, se sugiere evaluar el efecto

de este compuesto sobre estos microorganismos como siguiente paso para determinar el potencial del *Aloe vera* para disminuir la carga bacteriana en cavidad bucal de perros domésticos.

Aunque la evaluación *in vivo* es la más relevante, a nivel *in vitro* también se evaluó la resistencia antimicrobiana por medio de una prueba de antibiograma, comparándolo con un control a una concentración diez veces más alta de clorhexidina que los productos evaluados. Se determinó que el producto con contenido de *Aloe vera* y el producto comercial no presentaban una diferencia significativa entre ellos, pero sí con el control utilizado ($p=0.02$). En la actualidad, no existen suficientes estudios, en tratamientos orales, que evalúen la resistencia microbiana a la clorhexidina, los estudios se limitan a su evaluación en superficies inertes. De acuerdo con Früh *et al.* (2022) las bacterias pertenecientes a los nichos orales tienen la capacidad para adaptarse a las concentraciones de clorhexidina y también de reducir su susceptibilidad a antibióticos. Este argumento es apoyado por Cieplik *et al.* (2019), donde se atribuye esta disminución de la susceptibilidad a antibióticos a una estimulación persistente de la bomba de expulsión activa (efflux), uno de los mecanismos de resistencia antibiótica mayor conocidos. Aunque no hubo una diferencia significativa entre los productos evaluados, el radio de inhibición de las concentraciones de clorhexidina (2%) es inhibitorio y está dentro del parámetro aceptable.

Además del crecimiento e inhibición bacteriana, también se evaluó la morfología de las bacterias antes y después de los tratamientos. Los resultados mostraron una disminución en bacilos cortos Gram + y cocobacilos Gram - en el producto con contenido de *Aloe vera* respecto a los demás productos donde los resultados aumentan o fueron invariables. En el caso de los cocos Gram -, el efecto fue invariable en el producto que contenía *Aloe vera* y en el producto de Clorhexin, mientras que en el producto Holliday se presentó una disminución. Respecto a los cocos Gram +, Clorhexin fue el único en demostrar invariabilidad, mientras los otros dos presentaron un aumento. Estos hallazgos sugieren una inhibición de la mayoría

de los grupos bacterianos, pero no de los cocos Gram + y Gram -. De acuerdo con Horner *et al.* (2012), existe una susceptibilidad reducida a la clorhexidina por los cocos Gram +, esto debido a su capacidad para generar resistencia a través de la bomba de expulsión activa, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio, donde el efecto rondó entre un aumento de su presencia e invariabilidad. Esta reacción pudo ser provocada por la eliminación de otros tipos bacterianos que cumplieran un papel competitivo en el bioma bucal, lo que se observa en los porcentajes iniciales de cocos Gram +, donde se iniciaba con números menores (Ruparell *et al.*, 2020). Estos resultados, favorecen el efecto del producto evaluado respecto a los demás, sin embargo, el impacto debería ser mayor por la adición del *Aloe vera*. Se sugieren estudios posteriores que puedan evaluar con una muestra más grande el efecto de este compuesto.

VI. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que la clorhexidina al 2% combinada con jugo de Aloe vera, disminuye la carga bacteriana y los grupos de bacterias en la cavidad oral de perros domésticos. Además, la inhibición que produce en cultivos bacterianos *in vitro* es la misma que el de otros compuestos que no contienen *Aloe vera*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Mohanna, M.T. y Quine, M.H. (2016). "Morphology and Classification of Bacteria". *Microbiology*, 7(3), 1-19.
2. Al-Eraky, M. M., Mohamed, N., Kamel, F., Al-Qahtani, A., Madini, M. A., Hussin, A. y Kamel, N. M. F. (2016). of Advanced Research Teaching Professionalism By Vignettes in Psychiatry for Nursing Students. *International Journal of Advanced Research*, 4(6), 625–634.
3. Alawadh, M. A. (2022). Gingivitis: An overall review for undergraduates. *Statpearls journal*, 23(1), 1-5.
4. Anderson, J. G., Peralta, S., Kol, A., Kass, P. H. y Murphy, B. (2017). Clinical and Histopathologic Characterization of Canine Chronic Ulcerative Stomatitis. *Veterinary Pathology*, 54(3), 511–519.
5. Anderson, J.G., Paster, B.J., Kokaras, A. y Chen, T. (2021). Characterization Of The Oral Microbiome In Canine Chronic Ulcerative Stomatitis. *Journal of immunology research*, 7(1), 1037-1044
6. Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y. y van Wezel, G.P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1). 1-43
7. Basso, M. L. (2019). Conceptos actualizados en cariología. *Rev Asoc Odontol Argent*, 107(1), 25–32.
8. Bellows, J., Berg, M. L., Dennis, S., Harvey, R., Lobprise, H. B., Snyder, C. J., Stone, A. E. S. y van de Wetering, A. G. (2019). 2019 AAHA Dental Care Guidelines for Dogs and Cats*. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 55(2), 49–69.
9. Berger, D., Rakhamimova, A., Pollack, A. y Loewy, Z. (2018). Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High-Throughput*, 7(3), 1–8.
10. Borah, B.M., Halter, T.J., Xie, B., Henneman, Z.J., Siudzinski, T.R., Harris S, Elliot, H. y Nancollas, G. (2014). Kinetics of canine dental calculus crystallization: an in vitro study on the influence of inorganic components of canine saliva. *Journal of*

Colloid and Interface Science;425:20–26

11. Brennan, C. A. y Garrett, W. S. (2019). *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(3), 166.
12. Brizuela M. y Winters R. (2022) Histology, Oral Mucosa. <https://www.statpearls.com/point-of-care/131327>
13. Bowden, G. H. W. (2000). The microbial ecology of dental caries. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(3), 138–148.
14. Bringel, M., Jorge, P. K., Francisco, P. A., Lowe, C., Sabino-Silva, R., Colombini-Ishikiriama, B. L., Machado, M. A. D. A. M. y Siqueira, W. L. (2020). Salivary proteomic profile of dogs with and without dental calculus. *BMC Veterinary Research*, 16(1).
15. Brookes, Z. L. S., Bescos, R., Belfield, L. A., Ali, K. y Roberts, A. (2020). Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *Journal of dentistry*, 103, 103497
16. Buelow, M. E., Marretta, S. M., Barger, A. y Lichtensteiger, C. (2011). Lingual lesions in the dog and cat: Recognition, diagnosis, and treatment. *Journal of Veterinary Dentistry*, 28(3), 151–162.
17. Bumm, C. V. y Folwaczny, M. (2021). Infective endocarditis and oral health — A Narrative Review. In *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* (Vol. 11, Issue 6, pp. 1403–1415). AME Publishing Company.
18. Camanocha, A. y Dewhirst, F. E. (2014). Host-associated bacterial taxa from Chlorobi, Chloroflexi, GN02, Synergistetes, SR1, TM7, and WPS-2 Phyla/candidate divisions. *Journal of Oral Microbiology*, 6(1), 1–11.
19. Cope, G. y Cope, A. (2011). The periodontium: an anatomical guide. *Dental Nursing*, 7(7), 376–378.
20. Cieplik, F., Jakubovics, N. S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E., y Al-Ahmad, A. (2019). Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern?. *Frontiers in microbiology*, 10, 587.
21. Cunha, E., Tavares, L. y Oliveira, M. (2022). Revisiting Periodontal Disease in Dogs: How to Manage This New Old Problem? *Antibiotics*, 11(12).

22. Dewhirst Floyd E., Klein Erin A., Thompson Emily C., Blanton Jessica M., Buckley Catherine M. F., Davis Ian J., Bennett Marie-Lousie y Marshall-Jones Zoe V. (2012). The Canine Oral Microbiome. *PLoS ONE*, 7(4), e36067.
23. Díaz Videla, M. y Rodríguez Ceberio, M. (2019). Las mascotas en el sistema familiar. Legitimidad, formación y dinámicas de la familia humano-animal. *Revista de Psicología*, 18(2), 44–63.
24. do Nascimento Silva, A., de Avila, E. D., Nakano, V. y Avila-Campos, M. J. (2017). Pathogenicity and genetic profile of oral Porphyromonas species from canine periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 83, 20–24.
25. Domínguez-Fernández, R., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J., Welti-Chanes, J., Alvarado-González, J., Garibay-Febles, V. y Gutiérrez-López, G. (2012). El gel de aloe vera: Estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 23–43.
26. Dramowski, A., Pillay, S., Bekker, A., Abrahams, I., Cotton, M. F., Coffin, S. E. y Whitelaw, A. C. (2021). Impact of 1% chlorhexidine gluconate bathing and emollient application on bacterial pathogen colonization dynamics in hospitalized preterm neonates – A pilot clinical trial. *EClinicalMedicine*, 37.
27. Enlund, K. B., Brunius, C., Hanson, J., Hagman, R., Höglund, O. V., Gustås, P., y Pettersson, A. (2020). Dog Owners' Perspectives on Canine Dental Health—A Questionnaire Study in Sweden. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(June), 1–10.
28. Finch, N. C., Syme, H. M. y Elliott, J. (2016) Risk Factors for Development of Chronic Kidney Disease in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30, 602-610
29. Figueiredo, L. C., Figueiredo, N. F., Cruz, D. F. da, Baccelli, G. T., Sarachini, G. E., Bueno, M. R., Feres, M. y Bueno-Silva, B. (2022). Propolis, Aloe Vera, Green Tea, Cranberry, Calendula, Myrrha and Salvia Properties against Periodontal Microorganisms. *Microorganisms*, 10(11), 2172.
30. Früh, R., Anderson, A., Cieplik, F., Hellwig, E., Wittmer, A., Vach, K. y Al-Ahmad, A. (2022). Antibiotic Resistance of Selected Bacteria after Treatment of the Supragingival Biofilm with Subinhibitory Chlorhexidine Concentrations. *Antibiotics*, 11(10).

31. Garrigues, Q., Apper, E., Chastant, S. y Mila, H. (2022). Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(1), 964–971.
32. Galperin, M. Y. (2013). Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiology Spectrum*, 1(2), TBS-0015-2012.
33. Guilloux CA, Lamoureux C, Beauruelle C. y Héry-Arnaud G. (2021) Porphyromonas: A neglected potential key genus in human microbiomes. *Anaerobe*.
34. Gupta, R. S., Mahmood, S. y Adeolu, M. (2013). A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum spirochaetes and its major clades: Proposal for a taxonomic revision of the phylum. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUL), 1–12.
35. Heng, H. C., Zulfakar, M. H., y Ng, P. Y. (2018). Pharmaceutical applications of Aloe vera. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 29(3), 101–116.
36. Horner, C., Mawer, D., y Wilcox, M. (2012). Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter?. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(11), 2547–2559.
37. Hussein, S. A. y Hamad, M. A. (2022). Mycoplasma from the upper respiratory tract and conjunctival infections in household dogs. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 36(1), 137–141.
38. INEGI, Encuesta Enbiare, D. E. B. A. (2021). *COMUNICACIÓN SOCIAL*.
39. Jales, S. T. L., Barbosa, R. de M., de Albuquerque, A. C., Duarte, L. H. V., da Silva, G. R., Meirelles, L. M. A., da Silva, T. M. S., Alves, A. F., Viseras, C., Raffin, F. N. y Moura, T. F. A. d. L. (2022). Development and Characterization of Aloe vera Mucilaginous-Based Hydrogels for Psoriasis Treatment. *Journal of Composites Science*, 6(8).
40. Johnson, E. L., Heaver, S. L., Walters, W. A. y Ley, R. E. (2017). Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine*, 95(1), 8.
41. Jumas-Bilak, E., y Marchandin, H. (2014). The Phylum Synergistetes, *The Prokaryotes* (pp. 384). Springer, Berlin, Heidelberg.
42. Kačirová, J., Sondorová, M., Mad'ari, A., Styková, E., Mucha, R., Nemcová,

- R., Marečáková, N., Farbáková, J. y Mad'ar, M. (2022). Detection of Periodontal Pathogens from Dental Plaques of Dogs with and without Periodontal Disease. *Pathogens*, 11(4).
43. Kaminski, J. (2021). Domestic dogs: Born human whisperers. *Current Biology*, 31(14), R891–R893.
44. Kane, S. F. (2017). *The effects of oral health on systemic health*.
45. Kangas, K. (2017). The importance of oral health and its impact on whole body health: methods of integrative oral health care. *Journal of the American Holistic Veterinary Medical Association*, 48(5), 27–35.
46. Kempf, S. C., Hortsch, M. y MacCallum, D. K. (2017). Don MacCallum's Michigan Histology. ISBN: 978-1-60785-470-8.
47. Lamster IB. y Pagan M. (2017). Periodontal disease and the metabolic syndrome. *International Dental Journal*. 67(2):67–77
48. Lemmons, M. y Beebe, D. (2018). *Oral Anatomy and Physiology: Principles and Practice*.
49. Lindhe, J. y Lang, N. (2017). *Periodontología Implantología Odontológica*.
50. Mehrotra N. y Singh S. (2022). Periodontitis. <https://www.statpearls.com/point-of-care/34401>
51. Manvitha, K., Bidya, B. y Karkala Manvitha, C. (2014). Aloe vera: a wonder plant its history, cultivation and medicinal uses. ~ 85 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), 85–88.
52. Mei, F., Xie, M., Huang, X., Long, Y., Lu, X., Wang, X. y Chen, L. (2020). Porphyromonas gingivalis and its systemic impact: Current status. *Pathogens*, 9(11), 1–23.
53. Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L. y Bermingham, E. N. (2018). Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *MicrobiologyOpen*, 7(5), 677–685.
54. Nakamura, S. (2020). Spirochete Flagella and Motility. *Biomolecules*, 10(4), 1–10.
55. Nasiri, P., Malekzadeh Shafaroudi, A., Moosazadeh, M., Poorkazemi, D., y

Mehrani Sabet, J. (2021). The Potential of Aloe vera as an Active Ingredient in Toothpaste Formulations: A Narrative Review. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*.

56. Negash, A. y Mohammed, N.. (2016). Common Antiseptics: Mechanism Of Action And Its Uses In Animal. *Nature and Science*. 52-56.

57. Niemiec, B., Gawor, J., Nemeč, A., Clarke, D., McLeod, K., Tuttle, C., Gioso, M., Steagall, P. V, Chandler, M., Morgenege, G. y Jouppi, R. (2020). Pautas dentales globales de la Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales. In *Journal of Small Animal Practice* • (Vol. 61). www.wsava.org

58. Nomura, R., Inaba, H., Yasuda, H., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Iwashita, N., Shirahata, S., Yoshida, S., Matayoshi, S., Yasuda, J., Arai, N., Asai, F., Matsumoto-Nakano, M. y Nakano, K. (2020). Inhibition of *Porphyromonas gulae* and periodontal disease in dogs by a combination of clindamycin and interferon alpha. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12.

59. Odermatt, A., Strajhar, P., y Engeli, R. T. (2016). Disruption of steroidogenesis: Cell models for mechanistic investigations and as screening tools. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 158, 9-21.

60. O'Neill, D. G., Mitchell, C. E., Humphrey, J., Church, D. B., Brodbelt, D. C. y Pegram, C. (2021). Epidemiology of periodontal disease in dogs in the UK primary-care veterinary setting. *Journal of Small Animal Practice*, 62(12), 1051–1061.

61. Olsén, L., Brissman, A., Wiman, S., Eriksson, F., Kaj, C. y Enlund, K. B. (2021). Improved oral health and adaptation to treatment in dogs using manual or ultrasonic toothbrush or textile of nylon or microfiber for active dental home care. *Animals*, 11(9).

62. Özavci, V., Erbas, G., Parin, U., Yüksel, H. T. y Kirkan, Ş. (2019). Molecular detection of feline and canine periodontal pathogens. *Veterinary and Animal Science*, 8.

63. Poppolo Deus, F. y Ouanounou, A. (2022). Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *International Dental Journal*, 72(3), 269–277.

64. Pressman, P., Clemens, R. y Hayes, A. W. (2019). Aloe vera at the frontier

of glycobiology and integrative medicine: Health implications of an ancient plant . *SAGE Open Medicine*, 7, 205031211987592.

65. Rathee, M. y Jain, P. (2022). Gingivitis,: <https://www.statpearls.com/point-of-care/2225>

66. Ruparell, A., Inui, T., Staunton, R., Wallis, C., Deusch, O. y Holcombe, L. J. (2020). The canine oral microbiome: Variation in bacterial populations across different niches. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–13.

67. Saavedra J. y Hernández R(Eds.), (2014). Histología. Biología celular y tisular. Instructivo de laboratorio, 6e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1503§ionid=99838924>

68. Salehi, B., Albayrak, S., Antolak, H., Kręgiel, D., Pawlikowska, E., Sharifi-Rad, M., Uprety, Y., Fokou, P. V. T., Yousef, Z., Zakaria, Z. A., Varoni, E. M., Sharopov, F., Martins, N., Iriti, M. y Sharifi-Rad, J. (2018). Aloe genus plants: From farm to food applications and phytopharmacotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9).

69. Sánchez, M., González-Burgos, E., Iglesias, I. y Gómez-Serranillos, M. P. (2020). Pharmacological Update Properties of Aloe Vera and its Major Active Constituents. *Molecules*, 25(6), 13–24.

70. Sangur, R., Bajwa, W., Mahajan, T. y Banerjea, A. (2016) Aloe vera: An Ancient Option for Modern Day Dental Problems. *International Journal of Contemporary Medical Research*, 3, 8.

71. Santibáñez, R., Rodríguez-Salas, C., Flores-Yáñez, C., Garrido, D. y Thomson, P. (2021). Assessment of changes in the oral microbiome that occur in dogs with periodontal disease. *Veterinary Sciences*, 8(12).

72. Nahar, S., Lee, D.-H., Bae, J.-W., Im, W.-T., Jahng, K. Y., Joh, K. y Cha, C.-J. (2018). Report on 30 unrecorded bacterial species of the phylum Firmicutes isolated from Korea in 2016. *Journal of Species Research*, 7(1), 50–59.

73. Silhavy, T. J., Kahne, D., y Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5).

74. Soi, S., Bains, V. K., Jhingran, R., Madan, R. y Srivastava, R. (2018). Gingiva

Tissue is the Issue : An Overview. *Asian Journal of Oral Health & Allied Sciences*, 8(1), 15–24.

75. Sujatha, G., Senthil Kumar, G., Muruganandan, J. y Srinivasa Prasad, T. (2014). Aloe Vera in Dentistry. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8(10), 101–111.

76. Surjushe, A., Vasani, R. y Saple, D. (2008). Aloe Vera: A short review. *Indian Journal of Dermatology*, 53(4), 166.

77. Thorne, S. (2018) Dealing with Dental Trauma. *Veterinary Practice Today*. 6 (5).

78. Thurnheer, T., Karygianni, L., Flury, M. y Belibasakis, G. N. (2019). Fusobacterium Species and Subspecies Differentially Affect the Composition and Architecture of Supra- and Subgingival Biofilms Models. *Frontiers in Microbiology*, 10(1), 1716–1724.

79. Tripathi N y Sapra A. (2022) Gram Staining. <https://www.statpearls.com/point-of-care/22389>.

80. Vartoukian, S. R., Palmer, R. M. y Wade, W. G. (2009). Diversity and Morphology of Members of the Phylum “Synergistetes” in Periodontal Health and Disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3786.

81. Vasudevan R (2017) Dental Plaques: Microbial Community of the Oral Cavity. *Journal of Microbiology and Experimentation* 4(1)

82. Wallis, C. y Holcombe, L. J. (2020). A review of the frequency and impact of periodontal disease in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 61(9).

83. Wang, Y., Huang, J. M., Zhou, Y. L., Almeida, A., Finn, R. D., Danchin, A. y He, L. S. (2020). Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli. *BMC Genomics*, 21(1), 1–9.

84. Wexler, A. G. y Goodman, A. L. (2017). An insider’s perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. *Nature Microbiology*, 2, 1–8.

85. Whitman, W. B. (2009). The modern concept of the procaryote. *Journal of Bacteriology*, 191(7), 2000–2005.

86. Willey, J. M., Prescott, L. M., Sandman, K. M. y Wood, D. H. (Dorothy H.

(2020). *Prescott'S Microbiology, Eleventh Edition*.

87. Xie, F. y Pathom-aree, W. (2021). Actinobacteria From Desert: Diversity and Biotechnological Applications. *Frontiers in Microbiology*, 12.