

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO DE BIOPELICULA MULTIESPECIES
PERIODONTAL *IN VITRO* EN ORDEN DE COLONIZACIÓN FASE I**

**Jennifer Tatiana Alfonso Torres
Paula Andrea Laverde González**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC.- MAYO 2019**

HOJA DE IDENTIFICACION

Universidad El Bosque

Facultad Odontología

Programa Odontología

Título: Estandarización de un modelo de biopelícula multiespecies periodontal *In Vitro* en orden de colonización Fase I

Grupo de Investigación: Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO

Línea de investigación: Microbiología Oral

Otra(s) institución(es) participante(s): AQUILABS S.A

Tipo de investigación: Pregrado

Estudiantes: Jennifer Tatiana Alfonso Torres
Paula Andrea Laverde González

Director: Dra. Yormaris Castillo Romero.

Codirector Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

Asesor estadístico: Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

Agradecimientos

Agradecemos principalmente a la Universidad el Bosque en la cual nos forjamos como profesionales; a la facultad de Odontología por abrir sus puertas y recibirnos siempre de la mejor manera, al Instituto UIBO- Laboratorio de Microbiología Oral y su líder la Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil por haber estado siempre pendiente del trabajo desarrollado durante estos años y la cual fue la responsable la Dra. Diana Marcela Castillo quien nos brindó sus conocimientos para llevar a cabo éste proyecto y a la Dra. Yormaris Castillo Romero quien nos guio desde el principio con paciencia, dedicación y rectitud como docente, brindándonos sus amplios conocimientos desde el inicio hasta el final de todo este proceso. También agradecemos muy especialmente al grupo de docentes de Microbiología Oral, a la Dra. Nathaly Delgadillo Salgado ya la Dra. Yineth Neuta Poveda por haber compartido sus conocimientos a lo largo de nuestra formación como profesionales.

Agradecemos a las entidades que colaboraron en la financiación de este proyecto, AQUILABS S.A, al Dr. Justo Calderón. Al instituto de Virología de la Universidad El Bosque, por su soporte en las microscopias de fluorescencia. Especialmente a Carolina Coronel y Sigrid Camacho.

Dedicatoria

Dedicamos este trabajo principalmente a Dios quién nos guio y acompañó a lo largo de nuestra carrera, dándonos fuerzas en bajas y altas para no desfallecer cuando se presentaron dificultades; a nuestros padres y hermanas quienes nos dieron su apoyo incondicional desde el principio, gracias por sus consejos, comprensión, amor, por los recursos económicos necesarios para lograr culminar esta etapa con éxito y que hoy por hoy somos lo que somos gracias a ellos, puesto que no fue fácil pero tampoco imposible.

De manera muy especial queremos dedicar este trabajo a la doctora Yormaris Castillo Romero quien durante este proceso fue nuestra mano derecha, la cual nos guio siempre de la mejor manera y con mucha paciencia transmitiéndonos sus diversos conocimientos, es cierto que no fue nada fácil pero con su ayuda todo se tornó menos complicado. Mil gracias por todo lo que hizo por nosotras, la queremos mucho y siempre la llevaremos en nuestros corazones.

Tabla de contenido

Resumen	
Abstract	
Lista de tablas	
Lista de figuras	
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico	3
2.1 Microbiota oral y biopelícula.....	3
2.2 Formación de la biopelícula dental.....	3
2.2.1 Factores que favorecen la adhesión bacteriana: características de las superficies a colonizar.....	4
2.2.1.1 Composición y características del esmalte dental.....	5
2.2.1.2 Saliva	6
2.2.1.3 Características de superficies de las bacterias y adhesión bacteriana	7
2.2.2 Pasos en la formación de la biopelícula	8
2.2.2.1 Película adquirida	8
2.2.2.2 Adhesión inicial y colonización primaria.....	9
2.2.2.3 Colonización secundaria y tardía.....	12
2.2.2.4 Comunicación bacteriana	13
2.3 Importancia de la biopelícula dental	15
2.3.1 Modelo de biopelícula orales	17
3. Planteamiento del problema.....	19
4. Justificación	21
5. Situación Actual en el área de investigación.....	22
6. Objetivos.....	24
6.1 Objetivo general.....	24
6.2 Objetivos específicos.....	24
7. Metodología del Proyecto.....	25
7.1. Tipo de estudio	25

7.2. Población y muestra	25
7.2.1 Criterios de inclusión	25
7.2.2 Criterios de exclusión	25
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información	26
7.3.1 Materiales y métodos	26
7.3.1.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	26
7.3.1.2 Ajuste de inóculos bacterianos	26
7.3.2 Obtención de láminas de esmalte	27
7.3.3 Preparación de la saliva.....	27
7.3.4 Formación de biopelícula fase I.....	28
7.3.4.1 Evaluación de la biopelícula multiespecie	29
7.3.4.2 Evaluación de viabilidad, pureza y crecimiento bacteriano en biopelícula...29	
7.3.4.3 Viabilidad bacteriana mediante el kit LIVE/DEAD™ BacLight™	30
7.3.4.4 Evaluación de la biopelícula por el método de cristal violeta.....	30
7.3.4.5 Microscopia electrónica de barrido (estructura de la biopelícula).....	31
7.3.5 Plan de tabulación y análisis	31
8. Consideraciones éticas	32
9. Resultados	33
9.1 Estandarización de inóculos bacterianos	33
9.2 Estandarización pool de saliva para biopelícula	33
9.3 Evaluación de la biopelícula: recuentos bacterianos de la biopelícula	34
9.4 Porcentaje de viabilidad bacteriana de la biopelícula.....	35
9.5 Análisis semi-cuantitativo de la formación de biopelícula	38
8.6 Microscopia Electrónica de Barrido	38
9. Discusión.....	42
10. Conclusiones	45
11. Perspectivas y recomendaciones	46

13. Referencias bibliográficas	47
14. Anexos	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promedio de recuentos bacterianos de inóculos estandarizados	33
Tabla 2. Análisis semi-cuantitativo de la formación de biopelícula con cristal violeta.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de adhesión bacteriana.....	10
Figura 2 .Fuerzas de gran alcance.....	11
Figura 3 .Pasos para la formación de la biopelícula oral multiepecies.....	12
Figura 4. Quorum mediada por oligopéptidos en bacterias Gram- positivas	14
Figura 5. Mecanismo de quórum en bacterias Gram – negativas	17
Figura 6. SDS page electrophoresis de la saliva	34
Figura 7. Electroforesis de productos de PCR para identificación de P.gingivalis.....	35
Figura 8. Porcentaje de viabilidad bacteriana de biopelículas sobre lámina.....	36
Figura 9. Reconstrucción 3D con software ImageJ de biopelícula.....	37
Figura 10. Reconstrucción 2D con el software ImageJ de biofilm.....	37
Figura 11. Microscopia electronica de barrido sobre láminas de diente sin acondicionamiento de saliva.....	39
Figura12. Microscopia electronica de barrido sobre láminas de diente acondicionadas con saliva.....	40

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviatura	Término
ABC	ATP blending Cassette
AI-2	Auto-inductor 2
ATCC	American Type Culture Collection
CHX	Clorhexidina
CPC	Cloruro de cetilpiritinio
DPD	S-4,5-dihidroxi 2,3-pentanodiona
Fa	Fuerzas de Van der Waals
Fe	Potencial Z
Ha	Hidroxiapatita
HOCl	Ácido hipocloroso
HSLs	Homoserina lactona acilada
IgA	Inmoglobulina A
MEB	Microscopía electrónica de Barrido
MEC	Microscopía electrónica confocal
PA	Película Adquirida
QS	Quorum sensing

RESUMEN

Antecedentes: La placa dental humana es uno de los sistemas de biopelícula más complejos en la naturaleza y el principal agente causal de infecciones orales prevalentes como la caries y la enfermedad periodontal; evitar la progresión de una biopelícula oral simbiótica a un estado disbiótico es uno de los principales retos en investigación

Objetivo: Estandarizar un modelo de biopelícula multiespecies periodontal in vitro en orden de colonización. **Métodos:** Se ajustaron inóculos bacterianos de las cepas *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Actinomyces israelii* ATCC 12012 *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 para alcanzar una concentración de $>1 \times 10^8$ UFC/mL. Las biopelículas orales fueron formadas en orden de colonización sobre láminas de esmalte vidrio de silicato. El crecimiento bacteriano fue confirmado por cultivo en agar Brucella; la viabilidad de las bacterias empleando el kit LIVE/DEAD. BacLight™ y evaluadas mediante microscopía de epifluorescencia para identificar células vivas de las células muertas calculando el porcentaje de viabilidad por análisis de intensidad de píxeles, empleando el software ImageJ. Adicionalmente fue determinado el porcentaje de formación de biopelícula por el método de cristal violeta. La conformación tridimensional de las biopelículas fue confirmada mediante Microscopía Electrónica de Barrido. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se muestran mediante estadística descriptiva **Resultados:** Se obtuvieron biopelículas puras y viables a los 7 días con microorganismos inicialmente inoculados a la biopelícula. Las biopelículas formadas sobre láminas sin saliva presentaron una mayor proporción de células muertas (56%) comparado con las células vivas (44%) y la conformación de la biopelículas fue más dispersa. Por el contrario, cuando se observaron las biopelículas formadas sobre láminas acondicionadas con saliva se evidencia una mayor proporción de células vivas y conformación de clúster con menor ocupación de área en superficie, pero mejor conformación de biofilm. **Conclusiones:** Se formaron biopelículas orales multiespecies periodontales con 6 bacterias sobre láminas de vidrio y esmalte con un porcentaje de viabilidad mayor al 50%. El acondicionamiento del esmalte y de las láminas de vidrio con saliva no favoreció cambios importantes en la viabilidad del biofilm.

Palabras Clave: Biopelícula oral, Cavidad Oral, colonización primaria, colonizadores tardíos

ABSTRACT

Background: Dental plaque is one of the most complex bio-film systems in nature and the main agent of oral infections such as caries and periodontal disease; hindering the progress of a symbiotic oral bio-film to a dysbiotic state is one of the main research goals. **Objective:** to standardize a periodontal multi-species bio-film model *in vitro* in order of colonization. **Methods:** Bacterial inocula with strains of *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Actinomyces israelii* ATCC 12012 *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 were adjusted in order to reach a concentration of $>1 \times 10^8$ UFC/ml. The biofilms were formed in colonization order on layers of silicate glass lacquer. Bacterial growth was confirmed by means of culture on Brucella agar, bacterial viability with the LIVE/DEAD kit BacLight™ and evaluated with epifluorescence microscopy. This was done in order to identify live cells from dead ones calculating the viability percentage with pixel intensity analysis using ImageJ software. Additionally, the formation of biofilm was determined using the violet crystal method. Tri-dimensional conformation of bio-film was confirmed with scanning electron microscopy. All experiments were carried out in triplicate and data presented as descriptive statistics. **Results:** Bio-films in a pure and viable state were obtained after seven days with micro-organisms initially inoculated into the film. The bio-films formed over layers without saliva presented higher proportion of dead cells (56%) compared with those with live cells (44%) and conformation was more disperse. Bio-films formed over layers conditioned with saliva present greater proportion of live cells and a cluster formation, with less area spread but better film conformation. **Conclusions:** Oral periodontal multi-species bio-films were formed with six bacteria on layers of glass and lacquer with a viability percentage greater than 50%. Conditioning of lacquer and glass did not favour important changes on the bio-film's viability.

Key words: oral bio-film, oral cavity, primary colonization, late colonizers.

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores desencadenantes de la periodontitis es la persistencia y disbiosis de la biopelícula. El control apropiado de esta, es el primer paso para la erradicación de los microorganismos responsables de las infecciones orales y es uno de los objetivos principales en el tratamiento clínico. Se conoce que la transición de salud oral a enfermedad periodontal es a menudo atribuida a un cambio dramático en la composición de la comunidad microbiana simbiótica compuesta en su mayoría por bacterias Gram positivas del género *Actinomyces* spp y *Streptococcus* spp a una comunidad microbiana disbiótica que se compone principalmente de una microbiota Gram negativa patobionte y patógena del filo Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetae, Bacteroidetes y Synergistetes (Hajishengallis G. 2015).

La formación de una biopelícula oral inicia con la adhesión de colonizadores iniciales a diferentes superficies en cavidad oral (Hu, XL et al., 2011). Como tal, la biopelícula oral puede considerarse como una transición de bacterias del microbioma planctónico al microbioma adherido en superficies orales duras y blandas. Esta transición está mediada por una diversidad de interacciones entre las bacterias y la superficie a colonizar (Hu, XL et al., 2011).

La adhesión bacteriana a las superficies es un paso crítico en la formación de biopelículas y uno de los blancos más importantes cuando se desean investigar terapias anti-biopelícula. La adhesión inicial es reversible, inespecífica y se rige principalmente por interacciones débiles como las fuerzas de van der Waals y las fuerzas electrostáticas moduladas por las propiedades fisicoquímicas tanto del sustrato como de la superficie bacteriana, incluida la energía libre de superficie, hidrofobicidad, potencial Z y carga superficial (Hu, XL et al., 2011).

Métodos moleculares recientes han revelado que casi todas las enfermedades orales son causadas por biopelículas dentales que se acumulan a través de la colonización secuencial y ordenada de múltiples bacterias orales (Blanc V et al., 2013). Una de las características más

notables de la biopelícula oral, es que las bacterias que crecen, con frecuencia expresan fenotipos que son diferentes de las de las bacterias planctónicas. Por lo anterior, el entendimiento de características de adhesión, colonización y las dinámicas metabólicas e interacciones microbianas de los microorganismos que crecen en biopelículas son indispensables, para ello es necesario el planteamiento de propuestas dirigidas al desarrollo y estandarización *in vitro* de modelos de biopelículas polimicrobianas, porque permitan el estudio, la detección, evaluación de sustancias antimicrobianas y/o genes blanco importantes en la formación de biopelículas orales (Blanc V et al., 2013).

En la línea de microbiología Oral del Instituto UIBO, se han analizado diferentes moléculas con actividad antimicrobiana en cultivos planctónicos. Sin embargo, no se cuenta con un modelo estandarizado de biopelícula periodontal multiespecie, para el estudio de estos potenciales productos como anti-biopelícula (Lafaurie GI et al., 2009), (Castillo DM. et al., 2015), (Lafaurie, GI. et al., 2015). Por esta razón, este estudio tuvo como propósito desarrollar y estandarizar un modelo de biopelícula periodontal *in vitro* en orden de colonización y analizar su estructura, composición y viabilidad celular para validar su uso en la evaluación a futuro de agentes anti-biopelículas, así como también evaluar cambios en la expresión génica de las comunidades microbianas asociadas a biopelículas disbióticas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Microbiota oral y biopelícula*

Las bacterias que se encuentran en la cavidad oral crecen en forma de biopelícula y recubren todas las estructuras orales, tanto tejidos duros como blandos. Estas biopelículas en las superficies duras se convierten en estructuras organizadas espacialmente que se pueden extender varios cientos de micrómetros por la superficie. Por el contrario, las superficies epiteliales, que continuamente se desprenden y se reponen, tienden a ser colonizadas por monocapas de microorganismos (Kuboniwa M et al., 2010). Las biopelículas microbianas orales son comunidades estructuradas, tridimensionales, unidas a una superficie sólida como lo es el esmalte de los dientes, la superficie de la raíz o implantes dentales y están incrustados en una matriz de exopolisacárida (Zijnge V et al., 2010).

2.2 *Formación de la biopelícula dental*

Existen bacterias que se rigen bajo dos estados, las bacterias planctónicas y las bacterias sésiles, las bacterias planctónicas no se encuentran adheridas a una superficie y fabrican señales químicas para la diferenciación y formación de estructuras como la cubierta polisacárida protectora (Sarduy B et al., 2016). Para la formación de una biopelícula, ésta se divide en tres fases: la formación de la película dental o bien llamada película adquirida es la etapa inicial la cual está constituida por componentes salivales, líquido gingival, productos bacterianos de células de los tejidos del huésped, esta biopelícula funciona como una barrera de protección que lubrica las superficies e impiden la desecación de esta, además aportan un sustrato al cual se fijan las bacterias (Chinea M. et al., 2006), luego de esto, comienza la colonización inicial y/o primaria en donde aparecen bacterias llamadas colonizadores primarios como lo son los microorganismos Gram positivos facultativos, *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguinis* y otras especies de *Streptococcus*, estos microorganismos se adhieren a la película por medio de adhesinas que interactúan con

receptores en la película dental y así se da la colonización y el crecimiento de otros microorganismos (Sarduy B et al., 2016).

Finalmente se da la colonización secundaria y la maduración cuando las bacterias han aumentado en número se inicia un proceso de sucesión ecológica autogénica, los microorganismos residentes modifican y gracias a esto ellos mismos pueden ser sustituidos por otros más adaptados al hábitat ya modificado; los colonizadores secundarios son los microorganismos que no colonizaron primeramente la superficies dentales limpias como la *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, especies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* las cuales se adhieren a las células de bacterias ya presentes en la biopelícula (Sarduy et al., 2016).

Entre la comunidad bacteriana que conforma la bioelícula, existen tres bacterias que son relevantes en el proceso de formación y progresión de la enfermedad periodontal: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythensis* (Quintero AJ. et al., 2011) (Díaz C. y col., 2010).

2.2.1 Factores que favorecen la adhesión bacteriana: características de las superficies a colonizar.

Las características de superficie son factores que determinan la colonización bacteriana en una biopelícula y benefician o impiden dependiendo de las condiciones del medio donde se encuentren, la adhesión inicial. Abalos C. et al., 2005, reportan que el material es muy importante ya que puede influenciar en los estadios iniciales de la adhesión; por otro lado, otra característica de superficie es la rugosidad, ya que aquellas superficies más rugosas pueden tener mayor retención de placa bacteriana. Generalmente por estas áreas porosas empieza la acumulación de bacterias debido a que se protegen mejor de los mecanismos naturales de defensa de autolimpieza. Además, al aumentar la rugosidad, aumenta el área de superficie y así mismo su energía superficial, siendo favorable para la adhesión bacteriana (AbalosC.etal., 2005).

2.2.1.1 *Composición y características del esmalte dental*

La parte externa más superficial del diente que está en contacto continuo con la saliva es el esmalte dental, éste es un tejido de origen ectodérmico duro, constituido por prismas que están formados por cristales de hidroxiapatita. Este compuesto mineral constituye el 95% del peso del esmalte, un 2% por materia inorgánica y de un 3 a 4% por agua (Einspahr HM et al., 1986), (Salinas MF. et al., 2004). En su composición participan tres iones los cuales van a dar como resultado la siguiente fórmula: $(Ca^{++})_{10} (PO_4^{-3})_6(OH^-)_2$

También pueden estar presentes otros iones como: $(Na^+, K^+, Mg^{++}, F^-, Cl^-, CO_3^{=})$ haciendo parte de la red de cristales o adsorbidos en su superficie (Einspahr HM et al., 1986), (Salinas MF. et al., 2004). La hidroxiapatita del esmalte dental es una estructura inorgánica producida a partir de un ser vivo (biogénico), que en sus procesos de formarse, desarrollarse, crecer y adaptarse es capaz de interactuar con sustancias presentes en la cavidad oral, permitiendo así el establecimiento de biopelículas sobre las superficies sólidas (Einspahr HM et al., 1986), (Salinas MF. et al., 2004). Las estructuras del esmalte y la hidroxiapatita dan lugar a potenciales electrostáticos que se extienden a la fase acuosa, la movilidad electroforética de una partícula va de la mano con el potencial electrostático donde los iones se adhieren a una partícula, el potencial zeta es importante en la absorción de proteínas, la formación de placa y la mineralización de los dientes, el esmalte tiene un potencial Z que varía de +16 a -25 Mv, esto depende de la temperatura, el pH, el medio de suspensión y la concentración del esmalte en el medio (Young A et al., 1997).

La superficie externa del esmalte dental está cargada con iones negativos por la acumulación de los grupos fosfatos de la hidroxiapatita, para que éstas cargas se neutralicen se retienen iones de calcio que provienen del medio los cuales van a servir como un "puente" que favorece la unión de los componentes de la saliva y del fluido crevicular por medio de sus grupos aniónicos: carboxilatos, fosfatos, sulfatos (Einspahr HM et al., 1986), (Salinas MF. et al., 2004).

Existen ciertas reacciones catalizadas por enzimas originarias de la saliva, bacterias, células epiteliales y leucocitos polimorfonucleares que van a permitir que la película adquirida

vaya transformando su composición, así mismo permitirá la adhesión, agregación y coagregación bacteriana hasta alcanzar un estado de madurez (Lamkin M S. et al., 1996).

2.2.1.2 *Saliva*

Hernández AA et al., 2012 en su artículo de revisión describen que la saliva es un líquido que humecta la cavidad oral, es secretada por las glándulas salivales mayores en el 93% de su volumen y de las menores en el 7% (Hernández AA. et al., 2012). Es considerada estéril en el momento que es excretada por las glándulas salivales, pero deja de serlo en seguida se mezcla con el fluido crevicular, restos alimenticios, microorganismos y células descamadas de la mucosa oral (Hernández AA. et al., 2012).

La saliva contiene proteínas que son secretadas entre un 85% y 90% por las células acinares. La cantidad de éstas varía según el método con el que se realice el estudio (Hernández AA. et al., 2012). Estas proteínas pueden ser clasificadas en dos grupos: proteínas como histatinas y las proteínas ricas en prolina que pueden modificar la adhesión, inhibir el crecimiento y la viabilidad bacteriana (Hernández AA. et al., 2012).

La lisozima es una proteína que tiene como función degradar la pared de las bacterias Gram positivas y formar complejos con IgA y con otras proteínas como la Peroxidasa (Hernández AA. et al., 2012). Por otro lado, las mucinas otorgan viscosidad a la saliva y forman complejos con las bacterias orales que bloquean adhesinas evitando así que se unan al epitelio mucoso. Estas también por su parte compiten con los receptores presentes en el epitelio al formar complejos con las IgAs y otras proteínas salivales, permitiendo su acción antibacteriana (Hernández AA. et al., 2012).

Por lo anterior, la saliva es importante en la formación de la película adquirida la cual es el primer paso para iniciar el proceso de formación de una biopelícula oral.

2.2.1.3 Características de superficies de las bacterias y adhesión bacteriana

Existen ciertas características de las superficies que son de gran importancia para la adhesión bacteriana, en donde una alta energía superficial del substrato favorece condiciones de hidrofilia y una baja energía superficial favorece condiciones de hidrofobia. Si la energía superficial de la bacteria es mayor que la del medio, la adhesión se ve beneficiada por la hidrofilia. Pero, en condiciones de hidrofobia, la energía superficial de la bacteria debe ser menor que la del medio para favorecer la adhesión (Absolom, DR. 1986).

En substratos inertes y en un esmalte pulido la energía superficial es menor. Según Busscher H. et al., 1997 la adhesión del *Streptococcus mitis* es beneficiada por las condiciones hidrofóbicas. Por el contrario, el *Streptococcus mutans* se adhiere mejor en condiciones de hidrofilia. Por los anteriores resultados los autores refieren que podría existir una vinculación cepa dependiente para las distintas superficies (Busscher H. et al., 1997).

Por ende, cuando las bacterias poseen mayor energía superficial existe mayor adhesión, dado que la saliva le confiere una baja energía superficial a la superficie que recubre porque aumenta el área de superficie entre la saliva y la base. También, las bacterias con mayor energía superficial tendrán más afinidad por substratos con mayor energía superficial e inversamente. Así, la baja energía superficial de los biomateriales reduce la adhesión y retrasa la maduración de la biopelícula (Busscher H. et al., 1997), (Lakhyani R et al., 2012).

Estudios como el de Gibbson R et al., 1986, confirman que sólo pequeñas diferencias en la película adquirida (PA), pero importantes, son cepa dependiente. Por ejemplo, una PA rica en mucinas, beneficia la adhesión del *S. mutans* y disminuye la capacidad de adhesión del *S. Sanguinis*. Por lo anterior, las propiedades físico-químicas del substrato pueden ser transferidas a su superficie alterando composición, densidad y configuración de la PA en cuanto al tipo de proteínas (Gibbons RJ et al., 1986).

2.2.2 *Pasos en la formación de la biopelícula*

La formación de biopelícula es un proceso de múltiples etapas. Inicia con la formación de la película adquirida, que es una película protéica acelular adherida sobre la superficie del diente, es seguida por adsorción de células bacterianas a la película adquirida. El primer paso de este proceso está dominado por interacciones débiles reversibles mediadas por fuerzas electrostáticas e hidrófobas. Donde intervienen todos los factores físicoquímicos descritos anteriormente y que favorecen la adhesión inicial (Gibbons RJ. et al., 1986).

El segundo paso es la adhesión irreversible causada por un cambio dependiente del tiempo a un estado de afinidad de enlace más alto, que implica la interacción de múltiples adhesinas sobre la superficie bacteriana y la matriz polimérica que recubre la superficie a colonizar (Gibbons RJ et al., 1986). Posteriormente, la división de las células bacterianas adheridas produce microcolonias. El crecimiento confluyente da como resultado la formación de biopelículas en placa, que aumenta en complejidad con el tiempo (Gibbons RJ et al., 1986).

2.2.2.1 *Película adquirida*

La formación de la biopelícula oral inicia con la adhesión bacteriana a la película adquirida. Esta se caracteriza por ser una delgada capa biológica que recubre todas las superficies de la cavidad oral, tanto tejidos duros como blandos, aparatos protésicos, restauraciones y la superficie de los elementos dentarios (Sarduy Bermúdez Lázaro et al., 2016); ésta es el resultado de la adsorción de proteínas y glicoproteínas salivales y del fluido crevicular, en donde también se encuentra constituida por desechos o productos bacterianos y de células de los tejidos del huésped.

En la formación de esta película adquirida se involucran fuerzas de atracción de distinta naturaleza como las de Van der Waals e hidrófobas, entre otras, entre las superficies dentarias y las biomoléculas dispersas que las rodean (David R et al., 1999; Bernardi G et al., 1972).

Dado que el esmalte del diente está constituido por cristales de hidroxiapatita, estos poseen una carga negativa superficial y para neutralizarse son atraídas cantidades equivalentes de calcio iónico que provienen de la saliva. Como las proteínas salivales poseen grupos aniónicos, se establecen uniones electrostáticas con calcio y de esta forma quedan adsorbidas en la hidroxiapatita del diente (Lamkin M et al., 1996). En cambio, las proteínas catiónicas interaccionan directamente con los grupos fosfato de la hidroxiapatita a través de enlaces iónicos. Posterior a estas uniones iniciales, existen otras interacciones entre las biomoléculas retenidas y la hidroxiapatita que contribuyen a reforzar la adhesión de la película adquirida (Bernardi G et al., 1972).

A través de reacciones catalizadas por enzimas provenientes de la saliva, bacterias, células epiteliales y leucocitos polimorfonucleares, la película adquirida va modificando su composición hasta alcanzar el estado de madurez (Lamkin M et al., 1996).

Lo anterior favorece la colonización microbiana de las superficies de los dientes. Por lo tanto, la adhesión a la película de los dientes es relevante para las interacciones de ciertas especies bacterianas orales con moléculas del hospedador (Hojo K et al., 2009).

2.2.2.2 Adhesión inicial y colonización primaria

La película adquirida (PA) provee sitios para la adhesión de bacterias orales, los cuales van a permitir la unión inicial en los primeros procesos de formación de la biopelícula (Busscher H et al., 1997).

El transporte de la bacteria se da por 3 mecanismos los cuales son: difusión, dinámica del fluido y por actividad propia de la bacteria, no va a existir alguna interacción entre la superficie y la bacteria hasta 50 nm de distancia. Cuando la bacteria se acerca a esta distancia aparece una atracción debido a las fuerzas de Van der Waals (F_a), que son debidas a un efecto dipolo entre moléculas o átomos (Ábalos C. 2005).

A medida que se va acercando la bacteria a la superficie y a una distancia más corta que la interacción por las F_a , se manifiesta una fuerza de repulsión por consecuencia de la carga

negativa de la bacteria y del material que tienden a ser del mismo signo. Esta fuerza es denominada “Potencial Z” (Fe). De la interacción de Fa y Fe dependerá de un mayor o menor acercamiento del microorganismo a la superficie del material (Figura 1) y es lo que se denomina Energía Gibbs ($G= H-TS$) que en este caso se expresa como: Energía Gibbs = $F_a - F_e$ (Ábalos C. 2005).

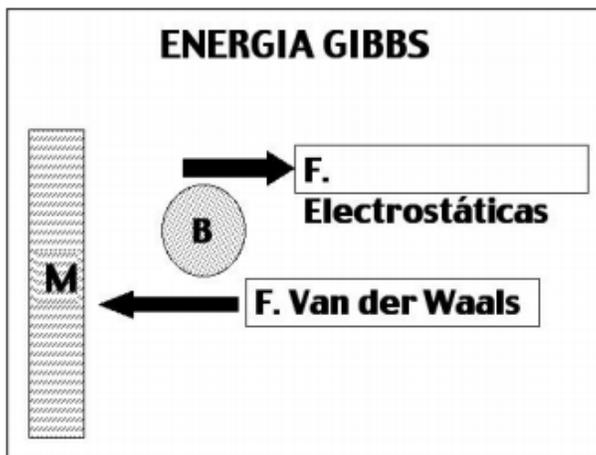


Figura 1. Mecanismos de adhesión bacteriana: Interacción de F_a y F_e consecuentes de un mayor o menor acercamiento del microorganismo a la superficie del material- Energía Gibbs. Tomado de: Ábalos C. Avances en Odontostomatología (2005).

El potencial Z depende de la carga iónica de la bacteria y de la superficie del material, pero también tiene una influencia el medio iónico en el que están sumergidas estas superficies. Normalmente, alrededor de la bacteria y del material, ambos con carga negativa, se forma una concentración de hidrogeniones del medio salivar para neutralizar la carga (Ábalos C. 2005). Dependiendo de los iones del medio se necesitará una capa de hidrogeniones del medio salivar mayor o menor para neutralizar la carga, obteniendo en las dos superficies una doble capa. Así, en medios iónicos mayores la doble capa es muy delgada lo que favorece un mayor acercamiento entre las dos superficies. Sin embargo, en medios iónicos medios o bajos, la doble capa es de mayor grosor y la distancia de la bacteria a la superficie

sólida es mayor, ya que la bacteria se detiene cuando las dobles capas entran en contacto (Figura 2) (Ábalos C. 2005)

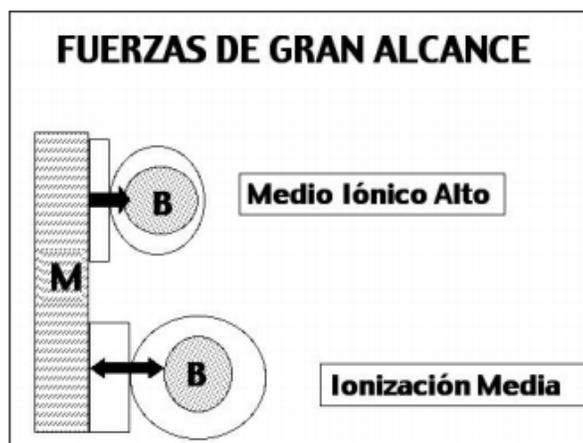


Figura 2 .Fuerzas de gran alcance: Se observan medios iónicos medios o bajos en donde la doble capa es de mayor grosor y la distancia de la bacteria a la superficie sólida es mayor, ya que la bacteria se detiene cuando las dobles capas entran en contacto Tomado de: Ábalos C. Avances en Odontoestomatología (2005).

El resultado de estas interacciones $F_a + F_e$ determinan el mayor o menor acercamiento de la bacteria a la superficie. Cuando la bacteria llega a de 2nm de distancia se podría predecir que la adhesión será irreversible, sin embargo, a una distancia de 10nm la bacteria dependiendo de su tamaño y de otros factores puede adherirse reversible o irreversiblemente. La dhesión puede considerarse reversible a distancias mayores (Ábalos C. 2005).

Muchos *Streptococcus* orales tienen la capacidad de unirse a proteínas tales como alfa-amilasa, proteínas y glicoproteínas ricas en prolina, y son reconocidos como los primeros colonizadores (Hojo K. et al., 2009). Esta capacidad puede conferir una ventaja a los *Streptococcus* en el establecimiento de placa dental temprana.

S. gordonii es uno de los primeros colonizadores en la biopelícula dental, actualmente considerado un patobionte por excelencia en la biopelícula dental (Hojo K. et al., 2009). Esta especie se une a las proteínas ricas en prolina ácidas que dan cuenta de 25 a 30% de las proteínas totales en saliva. La proteína A de *S. gordonii* interactúa con la amilasa salival, lo que sugiere que esta interacción contribuye a la unión de este microorganismo a la

superficie del diente (Hojo K et al., 2009). En la figura 3 se describen las principales etapas de formación de una biopelícula oral multiespecies.

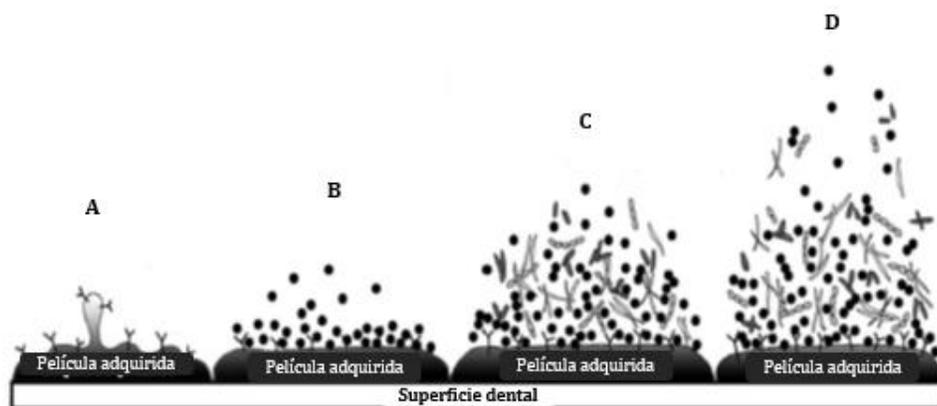


Figura 3 . Pasos para la formación de la biopelícula oral multiespecies: en la figura se presentan la secuencia de eventos necesarios para el establecimiento de una biopelícula madura multiespecies. (A) Formación de la película adquirida, (B) colonización inicial: adhesión, (C) agregación y coagregación de diferentes especies para formar una biopelícula Madura, (D) dispersión y colonización a nuevos sitios. Tomado de: Huang et al., *Virulence* (2011).

2.2.2.3 Colonización secundaria y tardía

Las células bacterianas planctónicas que no pueden colonizar directamente la superficie del diente se pueden unir a través de receptores a las superficies celulares de los primeros colonizadores que se unieron a la película adquirida. Este proceso denominado coagregación es una reacción específica de célula a célula que se produce entre células bacterianas distintas y es uno de los mecanismos más importantes que subyacen a la colonización bacteriana oral y la formación de biopelícula dental (Hojo K et al., 2009).

Los primeros colonizadores predominantes de las biopelículas de placa subgingival son las especies de *Actinomyces* spp y *Streptococcus* spp. Posteriormente, colonizadores secundarios como *Fusobacterium nucleatum* y especies de *Prevotella* se co-agregan a la

biopelícula (Blanc V. et al., 2013). Tardíamente una comunidad microbiana compleja se desarrolla con la llegada de los colonizadores terciarios como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, y *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Blanc V. et al., 2013). Estos colonizadores posteriores expresan numerosas adhesinas que favorecen la unión a menudo "elección" con socios que son metabólicamente compatibles. Por otra parte, un número de los colonizadores secundarios, en particular, *F. nucleatum* puede unirse tanto a los primeros colonizadores y a colonizadores tardíos, funcionando como puente o nodo a los consorcios polimicrobianos en desarrollo (Zijnge V. et al., 2010).

2.2.2.4 Comunicación bacteriana

Para las bacterias orales, los nutrientes están disponibles a partir de saliva, fluido crevicular gingival, azúcares alimentarios que contienen restos de alimentos, y productos metabólicos de otras bacterias. Las comunicaciones metabólicas entre las bacterias orales pueden ocurrir a través de la excreción de un metabolito de un organismo que se puede utilizar como nutriente por un organismo diferente, o por medio de la ruptura de un sustrato por la actividad enzimática extracelular de un organismo que crea sustratos biológicamente disponibles para diferentes organismos (Jang Y. et al., 2013).

Así mismo, el Quorum Sensing (QS) es el mecanismo que emplean las bacterias para la comunicación célula - célula y la regulación de la expresión genética. Las bacterias Gram positivas utilizan como moléculas de señalización celular, también conocidos como autoinductores, oligopéptidos procesados para su comunicación mientras que la homoserina lactona acilada (HSLs) es el autoinductor que emplean las bacterias Gram negativas, tanto los oligopéptidos procesados como la homoserina lactona acilada le permiten a las bacterias regular actividades fisiológicas tales como la formación de biopelículas, la simbiosis, la virulencia, la motilidad, la esporulación entre otros (Jang Y. et al., 2013).

La producción de HSL y la detección dependen de proteínas activadoras de la transcripción de los genes *LuxI* y de tipo *LuxR*. Mientras que los oligopéptidos se sintetizan como

precursores de péptidos que se procesan, modifican y exportan utilizando un sistema de secreción tipo I *ATP binding cassette* (ABC) (Sherry L. et al., 2016).

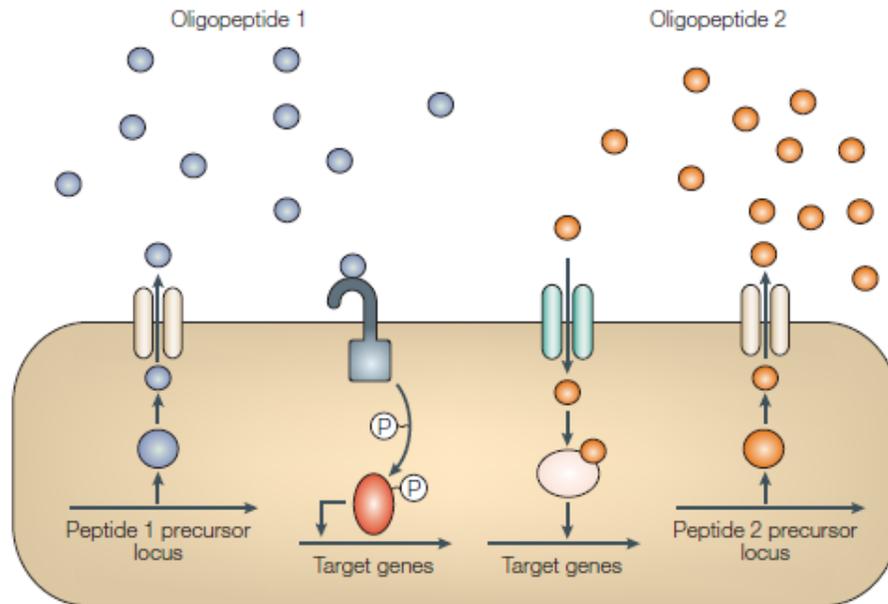


Figura 4. Detección de Quorum mediada por oligopéptidos en bacterias Gram- positivas. Las señales oligopéptidas se sintetizan como péptidos precursores, se procesan, modifican y se exportan mediante el sistema ABC, estos exportan fuera de la célula hacia el medio ambiente donde las moléculas se acumulan a medida que aumenta la densidad celular. Tomado de: (Lazdunski A. et al., 2004).

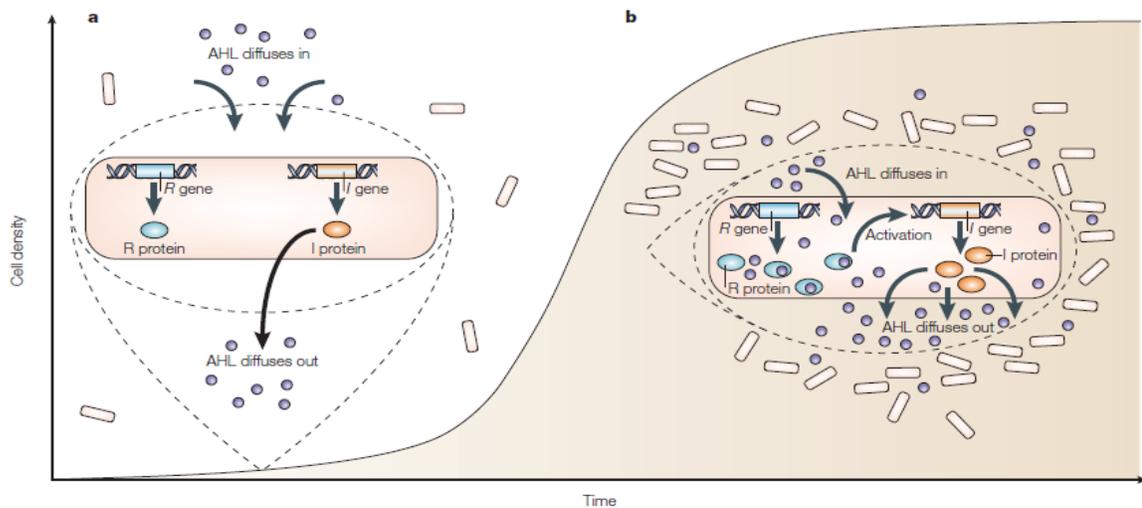


Figura 5. *Quorum Sensing en bacterias Gram – negativas: los homólogos luxR codifican el regulador transcripcional (proteína R) y los homólogos luxI codifican la homoserina lactona acilada (proteína I) a: a bajas densidades de células bacterianas las moléculas de la homoserina lactona acilada se sintetizan y se acumulan, dependiendo de la longitud de la cadena de acilo, la homoserina lactona acilada se difunde o se bombea fuera del entorno local donde las moléculas están disponibles para la fusión o absorción. b. Altas densidades de células bacterianas se acumula la concentración de moléculas de homoserina lactona acilada. Tomado de: (Lazdunski A et al., 2004).*

El Autoinductor-2 (AI-2) es una molécula señal ampliamente distribuida en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, también denominada molécula auto inductora universal. Se conoce por ser la más conservada vía de señalización celular, producida por reordenación espontánea de S-4,5-dihidroxi 2,3-pentanodiona (DPD), que es el producto del catabolismo de S-adenosil producido por el gen *LuxS*. El AI-2 permite la comunicación multi-específica entre comunidades bacterianas y regula la expresión de genes que afectan a diversos fenotipos que influyen en la virulencia, la adhesión, y la formación de biopelículas (Jang Y. et al., 2013). Es una molécula importante del QS en las bacterias orales y tiene un rol fundamental en la formación de la biopelícula dental. Su producción se ha informado en *Streptococcus* orales incluyendo *S. gordonii*, *S. oralis* y *S. mutans*, así como en microorganismos anaerobios incluyendo a *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis* y *microaerofilicos* como *A. actinomycetemcomitans* (Jang Y. et al., 2013).

2.3 Importancia de la biopelícula dental

La biopelícula dental, es el factor etiológico principal de las enfermedades orales más frecuentes, como la caries dental y enfermedades periodontales. El control adecuado de la acumulación de biopelículas en los dientes ha sido la piedra angular de la prevención de la periodontitis y la caries dental. La remoción mecánica de la placa es la base para la prevención de enfermedades orales, pero requiere la cooperación del paciente y la motivación; por lo tanto, es necesario implementar modelos de biopelícula oral *in vitro*, que permitan evaluar sustancias antimicrobianas para el control químico de la placa dental, así

como para detectar e identificar blancos terapéuticos importantes para el control de la placa (Jafer M. et al., 2016).

La formación de biopelículas orales *in vitro* ha sido implementada en diferentes estudios. Principalmente Jaffar N et al., 2016 en su estudio investigaron la habilidad de formación de la biopelícula de los patógenos periodontales *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, en superficies densas y porosas de esmalte y dentina, respectivamente. Estos experimentos mostraron una mayor formación de biopelículas en la superficie porosa de la hidroxiapatita (HA) (Jaffar N et al., 2016).

Por otro lado, en el desarrollo de un modelo de biopelícula *in vitro* sobre prótesis dental, donde se analizó la viabilidad y composición microbiana después de un régimen de higiene oral definido. Se demostró que el tratamiento combinatorio de cepillado y limpieza resultó ser el mejor régimen de higiene. Sin embargo, se mantuvieron algunos organismos residuales que podrían actuar como un depósito para el nuevo crecimiento de la biopelícula (Sherry L et al., 2016).

Así mismo en el efecto anti-biopelícula del ionómero de vidrio en biopelículas de *S. mutans*. Se analizó la actividad metabólica de la biopelícula y el metabolismo del ácido láctico. La expresión de genes de glucosil transferasa *gtfB*, *gtfC* y *gtfD* se midieron por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los resultados mostraron que la expresión de *gtfB*, *gtfC* y *gtfD* disminuyó (Wang S. et al., 2016). El control apropiado de la biopelícula dental es el primer paso para la erradicación de los microorganismos responsables de infecciones orales y es uno de los objetivos principales en el tratamiento clínico (Wang Z. et al., 2015).

2.3.1 Modelos de biopelículas orales

Robert J. et al., 2001 reportaron un modelo de biopelícula *in vitro* desarrollado en placas de vidrio, las cepas bacterianas seleccionadas fueron *S.gordonii*, *S. oralis* y *A. naeslundii* cultivadas en caldo BHI durante toda la noche a 37°C. En donde hubo un patrón de crecimiento dependiente de una película acondicionada con saliva, para la bacteria *A. naeslundii* y *S. gordonii*. Estas bacterias se adhirieron mejor al vidrio acondicionado con saliva, por el contrario, la adhesión de *S. oralis* fue dos veces mayor en ausencia de una película acondicionada con saliva (Robert J. et al., 2001). Como resultados obtuvieron que ni *A. naeslundii* ni *S. oralis* fueron capaces de crecer de forma sostenida como una biopelícula con un 25% de saliva como única fuente de nutrientes. En contraste, *S. gordonii* creció como biopelícula al metabolizar el 25% de la saliva (Robert J. et al., 2001).

Por otro lado, Guggenheim et al., 2001 desarrollaron un modelo *in vitro* de placa supragingival utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos específicos para cada una de las especies evaluadas (*A. naeslundii*, *Veillonella dispar*, *F. nucleatum*, *Streptococcus sobrinus* y *S. oralis*) junto con microscopía de escaneo láser confocal, se evaluaron los volúmenes y la distribución de las cinco cepas durante la formación de biopelícula. Estas cepas se formaron en discos de hidroxapatita, realizaron tres ensayos independientes, en cada uno de los cuales recuperaron seis o siete biopelículas por punto de tiempo. Los autores examinaron mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM) (M. Guggenheim et al., 2001). Determinaron que después de la incubación anaeróbica durante 72 h, la diferenciación de las cinco especies se logró mediante la observación de la morfología general de la colonia junto con el examen microscópico de las células de las colonias seleccionadas. Se promediaron nueve valores de UFC independientes por especie por punto de tiempo (M. Guggenheim et al., 2001).

Bermejo et al., 2019 describieron la formación temprana de biopelículas sobre implantes dentales completos con su micro y macroestructura, utilizaron un modelo de biopelículas multiespecies *in vitro* (Bermejo P. et al., 2019). Como resultados obtuvieron que las bacterias colonizan los implantes en un corto período de tiempo; por otro lado, que las biopelículas alcanzaron un estado de madurez a las 96 horas, mostrando diferentes

proporciones de células vivas / muertas dependiendo de su ubicación (Bermejo P. et al., 2019). Sin embargo, este modelo es completamente diferente al nuestro ya que la biopelícula sobre implantes maneja otro patrón de formación otras características de superficie. La evidencia científica ha demostrado que existe gran variabilidad en las biopelículas orales dependiendo de la naturaleza del modelo, características de superficie y variabilidad de los microorganismos empleados *in vitro* en la formación de la biopelícula. Sin embargo, independientemente de estos factores, existen unos patrones que se mantienen, tales como la necesidad de una película adquirida para favorecer la ionización de la superficie, carga, tensión superficial y potencial Z, que favorecen la adhesión bacteriana, así como el orden de colonización necesario para la adhesión por algunas especies. Por todo lo anterior es indispensable establecer un modelo de biopelículas *in vitro* que a futuro permita ampliar los conocimientos en diferentes líneas de investigación oral cuando desean evaluar potenciales terapia anti- biopelículas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La placa dental humana es uno de los sistemas de biopelícula más complejos en la naturaleza y el principal agente causal de infecciones orales altamente prevalentes y costosas como la caries y la enfermedad periodontal. Para facilitar el estudio de la biopelícula oral, las especies bacterianas que se encuentran en la placa dental se han dividido en colonizadores primarios; colonizadores secundarios y colonizadores tardíos (Blanc V. et al., 2013).

Blanc et al., 2013 desarrollaron y caracterizaron un modelo de biopelícula *in vitro* en condiciones de flujo regulado y demostraron la utilidad del modelo para la evaluación de agentes antiplaca como la (CHX) al 0,12% más 0,05% de cloruro de cetilpiridinio (CPC + CHX); CHX al 0,12%; y 0,12% de CHX más el fluoruro de sodio (NaF + CHX). La prueba de eficacia demostró que las células en biopelícula tienen mayor tolerancia a los enjuagues en comparación con células planctónicas (Blanc V. et al., 2013). Muchas sustancias antimicrobianas han sido desarrolladas en el mundo y evaluadas para el control de la formación de biopelícula oral. La CHX ha sido estudiada en la inhibición de la placa dental y es ampliamente utilizada en protocolos de desinfección de toda la boca. Sin embargo, su uso prolongado no está indicado debido a los efectos adversos relacionados con pigmentación dental y alteración del gusto (Van Strydonck DA. et al., 2012). Así mismo el efecto del enjuague bucal con aceites esenciales, Meridol y Colgate Plax ha sido evaluado sobre cultivos planctónicos de *A. actinomycetemcomitans* comparado con un control observándose una reducción del 99,99% en comparación con el control (Sherry L. et al., 2016).

El instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral) de la Universidad El Bosque, en una alianza colaborativa con la empresa privada Aquilabs S.A., han mantenido una línea de investigación y han desarrollado diferentes estudios (Lafaurie et al., 2009) que evalúan la eficacia del ácido hipocloroso (HOCl) sobre cultivos planctónicos. Esta molécula ha

demostrado tener un efecto antimicrobiano sobre cepas orales como *S. mutans*, *A. israelii*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. Sin embargo, no ha sido evaluada como agente antiplaca capaz de inhibir la formación de una biopelícula oral multiespecie *in vitro* (Castillo DM et al., 2015). Dado que la placa dental se estructura como una biopelícula multiespecie, entender la diversidad de la comunidad microbiana es un factor crítico y evaluar los patrones de distribución y dinámica de estas comunidades que crecen en biopelícula a través del desarrollo y estandarización de modelos de biopelícula periodontal sobre esmalte de dientes humanos es indispensable, sin embargo, no se cuenta con un modelo estandarizado de biopelícula periodontal, para el estudio de estos potenciales productos como anti-biopelícula. Por esta razón, este estudio tiene como propósito estandarizar un modelo de biopelícula oral multiespecie *in vitro* y analizar su estructura, composición y viabilidad celular para validar su uso en estudios posteriores de agentes anti-biopelícula.

4. JUSTIFICACIÓN

Evitar la progresión de una biopelícula oral simbiótica a un estado disbiótico es uno de los principales retos en investigación, para ello es necesario conocer y entender la dinámica de estas comunidades complejas mediante la creación de modelos de biopelículas poli-microbianas que permitan analizar su estructura, composición, viabilidad celular, dinámica, y a futuro expresión de genes asociados con la comunicación celular y formación de biopelícula, así como la evaluación de sustancias antiplaca (Wang Z. et al., 2015).

La microbiota de la cavidad oral es diversa, y alberga más de 700 especies bacterianas distintas que desempeñan papeles importantes en el mantenimiento de la salud oral. Sin embargo, la acumulación de biopelícula dental, acompañado por un cambio en la composición bacteriana, conduce a la aparición de enfermedades dentales, tales como la caries dental, gingivitis y periodontitis. Esta composición bacteriana a menudo cambia de una biopelícula escaso dominado por bacterias Gram positivas, por lo general encontradas en individuos sanos, a un aumento del número de bacilos Gram negativos anaerobios, normalmente observadas en periodontitis (Hojo K. et al., 2009).

El entendimiento actual del microbioma oral y la diversidad de la comunidad microbiana, es un factor crítico el estudio del microbioma humano y ha permitido comprender la estructura de estas comunidades, su biología y ecología. Así como descubrimiento de taxones nuevos, que han cambiado el paradigma sobre el rol de algunas especies microbianas en el inicio y progresión de enfermedades orales como la periodontitis (Li K. et al., 2012). En este sentido, la estandarización de modelos de biopelículas *in vitro* fundamentados bajo los nuevos paradigmas de desarrollo y progresión de la periodontitis, permiten validar teorías planteadas a partir de resultados obtenidos de estudios actuales con métodos independientes de cultivo. Por esto, el propósito de este estudio es estandarizar un modelo de biopelícula periodontal multiespecies *in vitro*, para analizar su estructura, composición y viabilidad celular y validar su uso en estudios futuros sobre la evaluación de agentes anti-placa

5. SITUACIÓN ACTUAL EN EL ÁREA DE INVESTIGACIÓN

Anteriormente se han realizado estudios de la formación de biopelículas orales *in vitro* las cuales han sido implementadas en diferentes estudios para: I) la evaluación de progresión de la enfermedad periodontal, como lo describe *Jaffar y et al., 2016* quienes investigaron la habilidad de formación de biopelícula de los patógenos periodontales *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, en una superficies densa y porosa de esmalte y dentina, respectivamente. Estos experimentos mostraron una mayor formación de biopelículas en la superficie porosa de la HA (Jaffar N. et al., 2016); II) el desarrollo de un modelo de biopelícula *in vitro* sobre prótesis dental, donde se analizó la viabilidad y composición microbiana después de un régimen de higiene oral definido. Se demostró que el tratamiento combinatorio de cepillado y limpieza complementaria como enjuague y uso de seda dental resultó ser el mejor régimen de higiene. Sin embargo, se mantuvieron algunos organismos residuales que podrían actuar como un depósito para el nuevo crecimiento de biopelícula (Blanc V. et al., 2013). III) la evaluación del efecto anti- biopelícula del ionómero de vidrio en biopelículas de *S. mutans*. Se analizó la actividad metabólica de la biopelícula y el metabolismo del ácido láctico. La expresión de genes de glucosil transferasa *gtfB*, *gtfC* y *gtfD* se midieron por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los resultados mostraron que la expresión de *gtfB*, *gtfC* y *gtfD* disminuyó (Wang S. et al., 2016).

Así mismo, Jang et al., 2013 evaluaron el efecto del AI-2 y QSIs de *F. nucleatum* en la formación de biopelículas de *S. gordonii* y *S. oralis*. Se observó que el AI-2 de *F. nucleatum* mejora significativamente el crecimiento en biopelículas de *S. gordonii*. Por el contrario, el AI-2 de *F. nucleatum* reduce la formación de biopelículas de *S. oralis*. Reportaron que la molécula señal Autoinductor 2 de *F. nucleatum*, tiene un efecto diferencial sobre los Estreptococos orales promoviendo su coagregación mientras que este proceso es inhibido en presencia de un inhibidor del AI-2 (QSIs) (Jang et al., 2013).

Blanc et al., 2013 desarrollaron y caracterizaron un modelo de biopelícula *in vitro* con bacterias orales que crecen bajo condiciones de flujo y demostraron la utilidad del modelo para la evaluación de la actividad de tres agentes antiplaca (Blanc V. et al., 2013). Del mismo modo Ammann et al., 2013 diseñaron una qPCR para cuantificar las bacterias presentes en un modelo de biopelícula subgingival *in vitro* y compararon los resultados cuantitativos con microscopía de fluorescencia y recuento de Unidades Formadoras de Colonias (CFU) en placas de agar selectivo (Ammann TW. et al., 2013).

La creación de modelos de biopelículas polimicrobianas, son importantes porque permiten el estudio, la detección, evaluación de sustancias antimicrobianas y/o genes blanco importantes en la formación de una biopelícula oral. Sin embargo, para ello es necesario establecer un sistema modelo de biopelícula oral *in vitro* y analizar su estructura, composición, viabilidad celular y dinámica de las comunidades microbianas, que a futuro pueda ser implementado para la evaluación de nuevos agentes antiplaca contra microorganismos orales con un control significativo de la caries dental y la enfermedad periodontal (Van Leeuwen et al., 2011).

6. OBJETIVOS

6.1 *Objetivo general*

Estandarizar un modelo de biopelícula multiespecie periodontal *in vitro* en orden de colonización.

6.2 *Objetivos específicos*

- Estandarizar cultivos bacterianos de los colonizadores primarios *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Actinomyces israelii* ATCC 12012 y colonizadores tardíos *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.
- Establecer un modelo de biopelícula multiespecies sobre láminas de vidrio y esmalte y obtenidos de dientes humanos.
- Evaluar y validar la estructura, viabilidad y formación del modelo de biopelícula multiespecies.

7. METODOLOGÍA

7.1 Tipo de estudio: *Experimental in vitro*

Se emplearon las cepas ATCC de las bacterias orales *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Actinomyces israelii* ATCC 12012, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Para el desarrollo de una biopelícula oral multiespecies *in vitro* formado sobre láminas de esmalte de las caras vestibulares de dientes premolares unirradiculares obtenidos previo consentimiento informado aprobado por el comité de ética institucional de la Universidad El Bosque y sobre láminas de vidrio.

7.2 Población y muestra

7.2.1 Criterios de inclusión

- 3 dientes premolares inferiores permanentes unirradiculares
- Dientes humanos recién extraídos.
- Dientes no cariados, con formación radicular completa, sin antecedente de tratamiento endodóntico.
- Dientes con indicación de exodoncia por fines ortodónticos.

7.2.1 Criterios de exclusión

- Dientes extraídos de personas menores de 18 años
- Dientes cariados, con formación radicular incompleta, con tratamiento endodóntico previo.

7.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información

7.3.1 Materiales y métodos

7.3.1.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *P. gingivalis* ATCC 33277, *A. israelii* ATCC 12012 y *F. nucleatum* ATCC 25586 fueron cultivadas en agar Brucella suplementado con (0.3% de Bacto agar, 0.2% de extracto de levadura, 5% de sangre de cordero, 0.2% de sangre hemolizada, 0.0005% de hemina y 0.00005% menadiona) y fueron incubadas a 37°C durante 8 días en condiciones anaeróbicas (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK). *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. oralis* ATCC 35037 y *S. mutans* ATCC 25175 se cultivaron en agar sangre suplementado con 5% de sangre de cordero en aerobiosis. Se verificó pureza de los cultivos y se cuantificaron los inóculos por espectrofotometría hasta alcanzar la densidad óptica deseada para cada bacteria con el fin de obtener 1×10^8 bacterias/mL.

7.3.1.2 Ajuste de inóculos bacterianos

Para las bacterias aerobias (*S. sanguinis*, *S. mutans* y *S. oralis*), los inóculos finales usados para la formación de la biopelícula fueron ajustados a partir de pre-inóculos crecidos de 8 horas. De estos pre-inóculos se tomó 1mL y se adicionó a un tubo falcón de 50mL servido con 15mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion). Este cultivo se dejó creciendo en agitación a 150 rpm a 37°C hasta obtener un cultivo en fase de crecimiento exponencial y una vez obtenida la densidad óptica deseada para obtener 1×10^8 bacterias/mL. Este procedimiento no fue realizado para bacterias anaerobias, las cuales fueron ajustadas directamente en caldo BHI a partir de placas de cultivo de bacterias previamente crecidas en condiciones anaeróbicas. Una vez se obtuvieron las densidades ópticas, se realizaron plaques en agar sangre para bacterias aerobias y en agar Brucella para bacterias anaerobias, de diluciones seriadas de cada inóculo hasta la dilución 10^{-8} y se confirmaron los recuentos bacterianos. Todos los

experimentos se realizaron por triplicado y los datos de los recuentos fueron expresados en promedio y desviación estándar.

7.3.2 *Obtención de láminas de esmalte*

Las láminas de esmalte fueron obtenidas a partir de dientes humanos recién extraídos, un total de 3 dientes premolares inferiores permanentes unirradiculares, no cariados, con formación radicular completa, sin antecedente de tratamiento endodóntico con indicación de exodoncia con fines ortodónticos los cuales después de su extracción se almacenaron en Cloramita T al 0.5% w/v, inmediatamente se realizó el retiro de tejido pulpar intraconducto, posteriormente se retiró el segmento coronal 1 mm por debajo de la unión amelo-cementaria de donde se obtuvieron los discos de esmalte y 5mm del segmento apical con un disco de diamante, obteniendo un cilindro de donde se cortaran láminas de las caras vestibulares de cada corona. Las láminas de esmalte se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121°C y fueron conservadas hasta su uso para la formación de la biopelícula.

7.3.3 *Preparación de la saliva*

Saliva no estimulada fue colectada de individuos voluntarios sanos, 2 horas antes cualquier tipo de higiene oral y/o consumo de alimentos. La recolección se realizó en tubos estériles y 10ml de saliva fueron tratados con 2.5mM de DL- Dithiothreitol (Sigma) durante 10 minutos para evitar la agregación de proteínas de la saliva. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue diluido 50% con PBS 1X y filtrado a través de una membrana de 0.22um de poro de baja unión a proteínas. Para la evaluación de la pureza y calidad de la saliva filtrada se realizarán plaqu coastos de la saliva filtrada en Agar Sangre, Agar MacConkey, Agar Sabouraud y Agar Brucella para confirmar que no exista presencia de bacterias. También se realizó cuantificación de proteínas con ácido bicinoníico y determinación del perfil electroforético e integridad de

las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes al 14% (SDS-PAGE) teñido con nitrato de plata.

7.3.4 Formación de biopelícula fase I: Película adquirida y colonización primaria

El modelo de formación de biopelícula, se desarrolló como lo describe *Ammann et al., 2013* con modificaciones. Un ciclo de pre-cultivo se realizó para las cepas de *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. oralis* ATCC 35037 y *S. mutans* ATCC 25175 antes de su inoculación en la biopelícula. Brevemente, los pre-cultivos o pre-inóculos fueron transferidos a un caldo BHI como se describe anteriormente en el ajuste de inóculos y se incubaron durante 8 H en condiciones de agitación (ciclo 1). Posteriormente, los pre-cultivos fueron diluidos 1: 15 en caldo BHI fresco y se incubaron durante 2:30 horas en agitación a 150rpm a 37°C (ciclo 2). El segundo ciclo de pre-cultivos fue omitido para las cepas de crecimiento lento *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. israelii*.

Antes de la inoculación, láminas de esmalte y/o vidrio fueron colocados en placas de 6 pozos y se incubaron durante 2 horas a 37°C con 2mL de saliva estéril en un agitador rotatorio a 90 rpm con el fin de formar la película adquirida.

Transcurrido este tiempo, la saliva fue removida y se adicionó 1,5mL del inóculo de *S. sanguinis* sobre cada pozo que contenía láminas de esmalte y/o láminas de vidrio pretratadas con saliva y sin saliva. Dos horas después de la incubación a 37°C, en microaerofilia, a cada pozo de formación de biopelícula se le adicionó un pool de 1,5mL de inóculo previamente ajustado de *S. oralis* y *S. mutans*. Este modelo se dejó en incubación en condiciones de microaerofilia a 37°C por 24 horas (anexo 1).

En la formación de biopelícula fase II: colonización tardía 24 horas después se cumplido el tiempo de la fase I de formación de biopelícula, se adicionó a la biopelícula inicial, 1,5 mL de un pool compuesto por los inóculos ajustados de *A. Isrraelii*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Esta biopelícula fue incubada a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 7 días (fase II).

En experimentos independientes este modelo fue desarrollado sobre láminas de esmalte y/o laminillas de vidrio de silicato de 22 mm x 22 mm (Knittel Glass) sin tratamiento con saliva; con el fin de comparar el modelo de estudio con otros modelos reportados en la literatura. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado. (Anexo 1).

7.3.4.1 *Evaluación de la biopelícula multiespecie*

La evaluación de la formación de la biopelícula consistió en I) determinar su viabilidad desprendiendo mecánicamente la biopelícula formada y realizando diluciones seriadas y plaqueo en agar Brucella suplementado con hemina y II) determinación de la formación semi-cuantitativa de la biopelícula con el método de cristal violeta III) evaluación de la viabilidad bacteriana con el kit comercial LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher), como lo hemos reportado previamente en Castillo et al., 2015.

IV) Evaluación de la conformación y estructura tridimensional de la biopelícula mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

7.3.4.2 *Evaluación de viabilidad, pureza y crecimiento bacteriano en biopelícula.*

Una vez formadas las biopelículas de 7 días sobre láminas de esmalte y laminillas de vidrio con y sin tratamiento con saliva y sobre laminillas de vidrio se determinó la viabilidad y crecimiento bacteriano en agar Brucella y agar sangre.

Las biopelículas formadas sobre láminas de esmalte o laminillas de vidrio fueron transferidas a placas estériles y se les adicionó 500 µL de caldo BHI y posteriormente la biopelícula fue desprendido mecánicamente por pipeteo. 100 µL de las bacterias desprendidas de la biopelícula fueron utilizados para realizar diluciones seriadas base 10 hasta la -8 y cada dilución fue plaqueda en agar Brucella suplementado, incubado a 37°C durante 8 días. Después de la incubación se determinaron los recuentos bacterianos a partir de las biopelículas. Así mismo, para aquellas bacterias de difícil crecimiento y que no fueron detectadas en el plaqueo como *P. gingivalis*, se confirmó su presencia por medio de

PCR convencional previamente estandarizada en el Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO. (Ashimoto et al., 1996)

7.3.4.3 *Viabilidad bacteriana mediante el kit LIVE/DEAD™ BacLight™*

Las biopelículas formadas sobre láminas de vidrio fueron transferidas a placas estériles, se realizó un lavado con PBS 1X y posteriormente cada lámina fue sumergida por 15 minutos en una mezcla 1: 300 del kit de viabilidad LIVE/DEAD™ BacLight™ (SYTO 9 a 3.34 mM y yoduro de propidio a 20 mM), para determinar el porcentaje de viabilidad de la biopelícula.

Las muestras se incubaron en condiciones de oscuridad durante 15 min. Los colorantes se utilizaron para diferenciar las bacterias con membrana intacta, vivas (fluorescencia verde) de las bacterias con membrana alterada, muertas (fluorescencia roja). Las imágenes se observaron en un microscopio de fluorescencia (Axio-Imager M2; Zeiss, Jena, Alemania) y fueron capturadas con el sistema Apotome 2.0 en objetivo 100X. Se realizaron reconstrucciones utilizando el software Zen 2.3 pro con una configuración en Z-Stack de 10 slices, rango 1.800µm, intervalo de 0.200 µm para todas las imágenes. Adicionalmente, las imágenes fueron guardadas realizando post processing con extended focus. El porcentaje de viabilidad se determinó por el número de píxeles para bacterias vivas y muertas utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) y los datos se expresaron como porcentaje de viabilidad, como lo describe Castillo DM et al., 2015.

7.3.4.4 *Evaluación de la formación de biopelícula por el método de cristal violeta*

Para calcular el porcentaje relativo de formación de biopelícula sobre pozos y/o sobre láminas de esmalte, se empleó el método de cristal violeta como lo describe previamente (Gutierrez D. 2018) con modificaciones.

Para tal fin las láminas de esmalte y/o vidrio, fueron transferidas a una nueva placa y lavadas con PBS 1X para remover bacterias no adheridas. A estas láminas se les adicionó 1mL de cristal violeta al 0,01% por 20 minutos. Transcurrido este tiempo, el cristal violeta

fue retirado y se adicionó 1mL de paraformaldehido al 2,5% por 30 minutos con el fin de fijar el cristal violeta a la biopelícula formado. Posteriormente, se removió la solución de fijación de las láminas de esmalte y se dejaron secando a temperatura ambiente por 1 hora.

Después de 1 hora, se adicionó a las láminas 1mL de etanol al 95% para disolver el cristal violeta adherido a la biopelícula formado y 150 μ L de esta solución fue transferida a placas de 96 pozos y las placas fueron leídas en un fotofluorómetro Infinite® 200 PRO Tecan, una longitud de onda (λ) de excitación: 595 nm y λ de referencia: 630 nm. Se obtuvieron las unidades de absorbancia y se calculó el porcentaje relativo de formación de una biopelícula comparado con la absorbancia de láminas de esmalte sin biopelícula. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

7.3.4.5 Microscopia Electrónica de Barrido (estructura y conformación de la biopelícula)

Las biopelículas formadas fueron fijadas en glutaraldehido al 2.5% por 2 horas y posteriormente tratadas con diferentes diluciones de etanol de 30 a 100%, para la preparación inicial de las muestras como lo describe Blanc V et al., 2013 con modificaciones (Blanc V et al., 2013). Las muestras previamente tratadas fueron enviadas al Centro De Microscopía de la Vicerrectoría De Investigaciones de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, para el servicio de observación en el Microscopio electrónico de transmisión.

7.3.5 Plan de tabulación y análisis

Se construyeron bases de datos en Microsoft Office Professional Plus Excel 2013 empleadas para calcular promedios y desviación estándar de las réplicas de los experimentos de ajustes y estandarización de inóculos bacterianos, así como de la formación de la biopelícula y viabilidad de las biopelículas formadas. Se realizó una estadística descriptiva y los datos fueron expresados resultados promedios y desviación estándar.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto cuenta con el aval de la vicerrectoría y el comité de ética de investigaciones. Numero de acta:

- El presente proyecto de investigación no realiza experimentación en humanos, animales ni organismos genéticamente modificados. Se acoge a las disposiciones vigentes para investigación básica *in vitro*.
- Las bacterias que se usaron en este estudio representan un riesgo menor al mínimo para la salud humana. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, resolución N° 008430 de 1993 del ministerio de salud.
- Se obtuvieron 50 dientes premolares inferiores permanentes unirradiculares obtenidos de pacientes que aceptaron mediante la firma de un consentimiento informado donar los dientes con indicación de exodoncia con fines ortodónticos, los cuales fueron utilizados para la obtención de láminas de esmalte necesarios para la formación de la biopelícula oral *in vitro*. Comité *ad hoc* acuerdo No 12239 de 2014. Proyecto UEB-431-2017.
- Todos los pacientes firmaron consentimiento informado ANEXO 1

9. RESULTADOS

9.1 Estandarización de inóculos bacterianos

Los inóculos fueron estandarizados en caldo BHI, los resultados que se muestran en la *Tabla 1* son representativos de experimentos realizados por triplicados, en donde se determinó el recuento bacteriano $\geq 1 \times 10^8$ bacterias/mL por plaqueo de diluciones seriadas de inóculos estandarizados.

Tabla 1. Promedio de recuentos bacterianos de inóculos estandarizados

Inóculos estandarizados			
Bacteria	Longitud de onda	DO	UFC/mL \pm (DE)
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	580nm	0,571-0,573	$1,6 \times 10^8 \pm (0,2)$
<i>S. oralis</i> ATCC 35037	580nm	0,560-0,561	$4,6 \times 10^8 \pm (0,2)$
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	600nm	2,168-2,177	$1,0 \times 10^8 \pm (0,0)$
<i>A. isrraelii</i> ATCC 12012	600nm	0,998-1,020	$1,0 \times 10^8 \pm (0,6)$
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	620nm	0,900-0,908	$1,6 \times 10^8 \pm (1,1)$

*Inóculos estandarizados *A. isrraelii* y *P. gingivalis* en el laboratorio de microbiología del Instituto UIBO (Ashimoto et al., 1996)

9.2 Estandarización pool de saliva para biopelícula

EL pool de saliva empleado en este estudio, fue caracterizado (figura 6) y se evidenció integridad de las proteínas por SDS-PAGE con un perfil de bandeo comparable con lo reportado en la literatura (Agric et al., 2009).

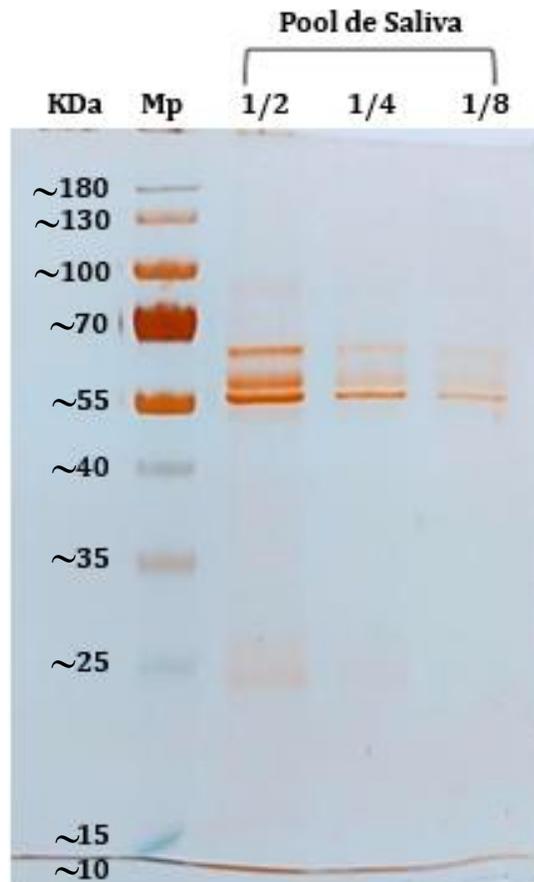


Figura 6. SDS-PAGE de la saliva y perfil de bandeo de las proteínas.

9.3 Evaluación de la biopelícula: recuentos bacterianos de la biopelícula

Se verificó la viabilidad de los microorganismos después de 7 días de crecimiento en biopelícula mediante plaqueo en agar Brucella suplementado, de los cuales, se confirma crecimiento de UFC de los microorganismos inicialmente inoculados a la biopelícula y correspondientes a: *S. oralis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *F. nucleatum*, y *A. israelii*, en donde también se pudo evidenciar que se obtuvo una biopelícula pura, es decir, que los microorganismos detectados fueron los mismos que se introdujeron en el inicio de la formación de la biopelícula y viables. *P. gingivalis* fue confirmada realizando PCR de la biopelícula desprendido de las láminas de esmalte y las láminas de vidrio plaqueadas en agar Brucella suplementado (figura 7).

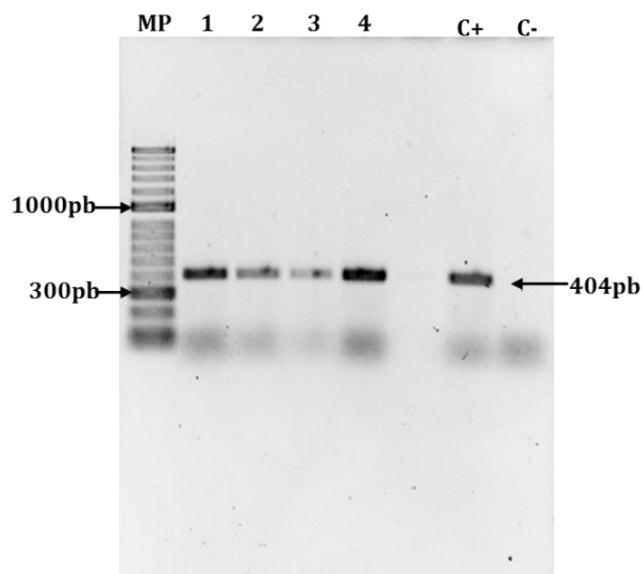


Figura 7. Electroforesis de productos de PCR para identificación de *Porphyromonas gingivalis*. MP: marcador de peso molecular (Hyperladder 50pb); carril 1-4. Biopelículas formadas sobre láminas de esmalte con y sin tratamiento de saliva y sobre láminas de vidrio con y sin tratamiento de saliva respectivamente. C+: control positivo ADN de *p. gingivalis* y C-: control negativo de PCR.

9.4 Porcentaje de viabilidad bacteriana de la biopelícula (LIVE/DEAD™ BacLight™)

El biofilm formado sobre láminas sin saliva tiene una proporción de células muertas (56%) comparado con las células vivas (44%). Por el contrario, cuando se observa las biopelículas formadas sobre láminas acondicionadas con saliva se evidencia una mayor proporción de células vivas (56%) que células muertas (44%) pero una menor formación de biopelícula lo cual sugiere que la saliva tiene un rol muy importante en la supervivencia bacteriana como se muestra en la figura 8.

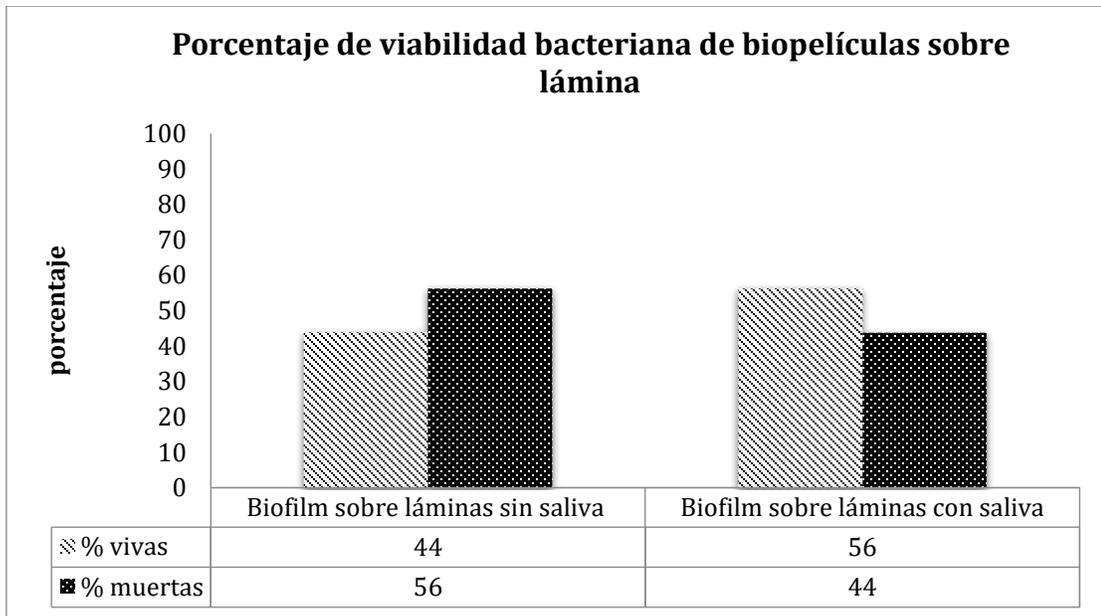


Figura 8. *Porcentaje de viabilidad bacteriana de biopelículas sobre lámina. Biofilm sobre láminas de vidrio con y sin saliva porcentaje de bacterias vivas vs bacterias muertas.*

En la figura 9. se observan una reconstrucción en 3D de la biopelícula formada sobre láminas de vidrio pretatadas con saliva y sin pretratamiento con saliva de 3 réplicas independientes, en estos resultados se pueden observar una conformación de biopelícula por clusters donde no hay una ocupación completa del área o de la superficie a colonizar sin embargo se observan clusters diferenciados, cuando analizamos las imágenes de formación de biofilm sobre laminas sin acondicionamiento de saliva se puede observar que hay una mayor presencia de células no viables o muertas. La figura 10 muestra el mismo biofilm formado sobre láminas de vidrio con y sin pretratamiento de saliva en 2D.

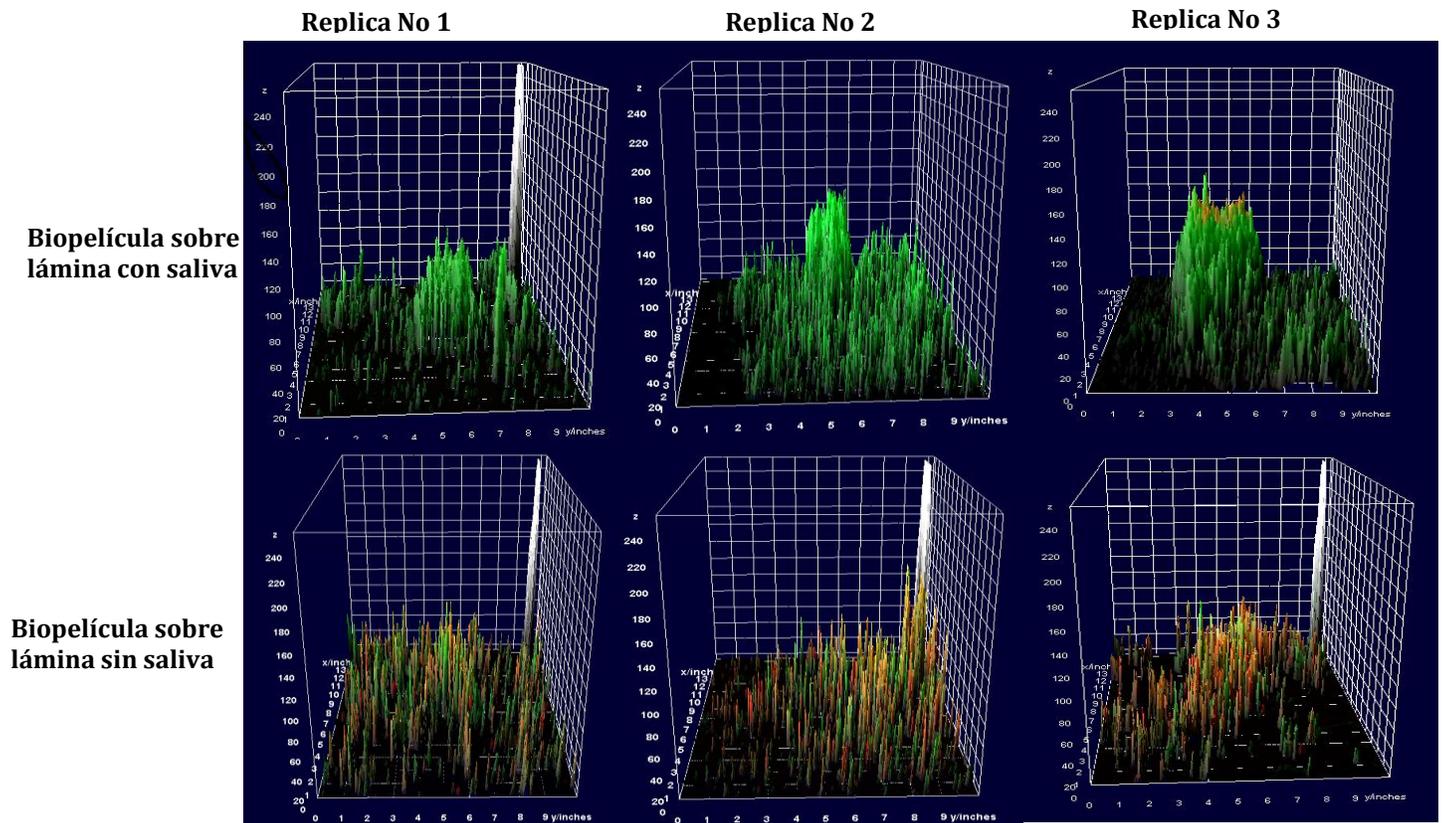


Figura 9. Reconstrucción 3D con el software ImageJ de biopelícula de 7 días formados sobre láminas de vidrio con y sin pretratamiento de saliva. Extended focus, Apotome.2.

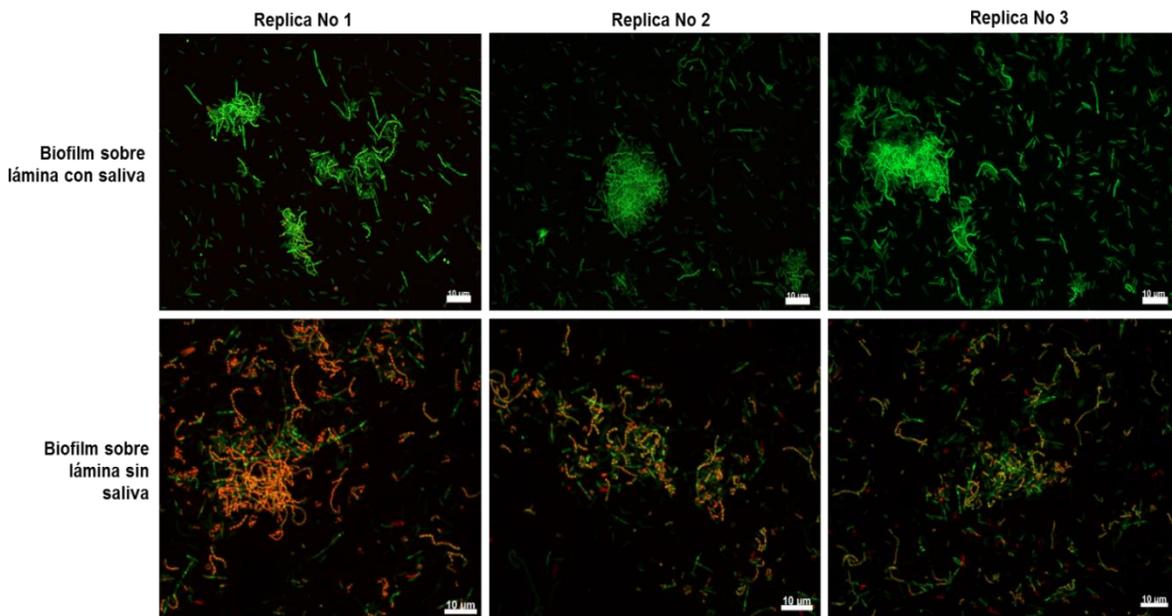


Figura 10. Imágenes 2D con el software ImageJ de biopelícula de 7 días formados sobre láminas de vidrio con y sin pretratamiento de saliva. Extended focus, Apotome.2

9.5 Análisis semi-cuantitativo de la formación de biopelícula (cristal violeta)

Los datos obtenidos de la cuantificación relativa de la formación de biopelícula analizados con cristal violeta, reflejan absorbancias mayores (0.19) en las biopelículas formadas sobre láminas de vidrio pretratadas con saliva. Estos resultados fueron inferiores cuando se compararon las biopelículas formadas sobre láminas de esmalte con saliva (0.07). No parece ser que la saliva este teniendo un papel importante en la formación de la biopelícula sino el material o la superficie empleada.

Tabla 2. Análisis semi-cuantitativo de la formación de biopelícula con cristal violeta

Promedio de absorbancia de las biopelículas con cristal violeta		
Condición	Promedio	DE
Biopelícula sobre esmalte con saliva	0,07	0,04
Biopelícula sobre lamina con saliva	0,19	0,06
Biopelícula sobre esmalte sin saliva	0,07	0,05
Biopelícula sobre lamina sin saliva	0,13	0,08

9.5.1 Microscopia Electrónica de Barrido

En las figuras 11-12, se observan las biopelículas representativas de 3 experimentos independientes, formadas sobre láminas esmalte sin acondicionamiento de saliva y pre-tratadas con saliva. En la figura 11A, se muestra la biopelículas formada sobre esmalte sin pre-tratamiento con saliva, aquí se pueden observar áreas de formación de biopelículas consolidadas en consorcios multiespecies en una magnificación de 2.1 kx con un área de cobertura 132 μm . Así mismo, en las figuras 11 B-D, se muestran otras magnificaciones de campos visuales que permiten identificar en un zoom mayor la organización tridimensional y co-agregaciones bacterianas. Por otra parte, en la figura 12 A-D, se observa la colonización de microorganismos sobre láminas del esmalte pre-tratadas con saliva. En la figura 12A, se muestran áreas de adhesión de cadenas de cocos escasas y dispersas, en una

magnificación de 2.1 kx con un área de cobertura 132 μm . En la figura 12B, se observan clúster de cocos con áreas poco cubiertas, se observan los cristales de hidroxiapatita con poca matriz polimérica recubriendo la superficie en una magnificación de 9,34 kx con un área de cobertura 29.6 μm . En las figuras C-D se muestran magnificaciones de cocos observados en diferentes áreas del esmalte. En las láminas de acondicionados con saliva, no se observa una biopelícula estructurada, la colonización es dispersa y predominan agrupaciones de cocos.

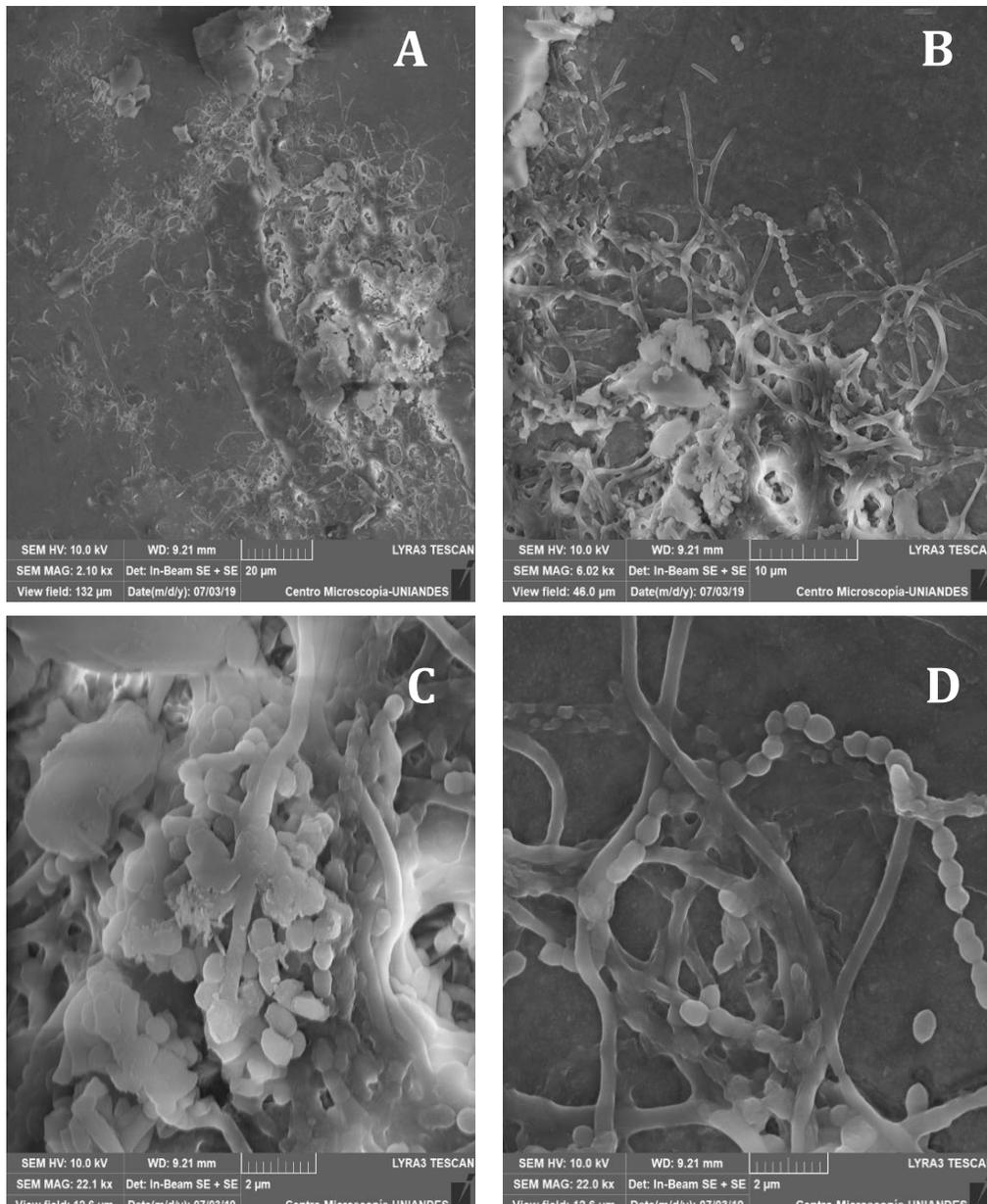


Figura 11. Microscopia electrónica de barrido de biopelículas representativas de 7 días formadas sobre láminas de diente sin acondicionamiento previo de saliva, LYRA3 TESCAN (Universidad de los Andes). A: Biofilm con un área de cobertura 132 μm , **B:** Co-agregaciones bacterianas en una cobertura de 46 μm , **C:** acercamiento biofilm multiespecies, **D:** acercamiento a 12,6 μm empalizadas de bacilos y cocos.

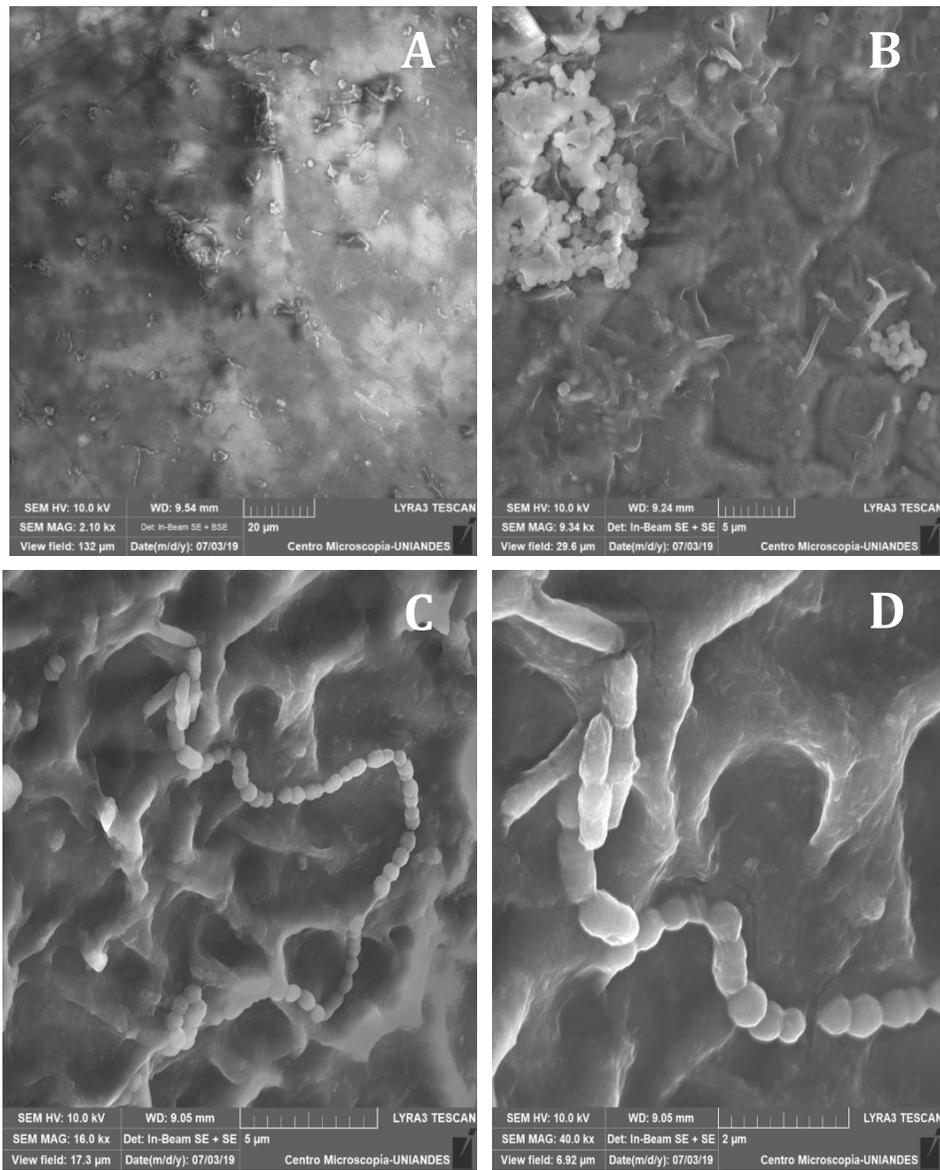


Figura 12. Microscopía electrónica de barrido de biopelículas representativas de 7 días formadas sobre láminas de diente acondicionados con saliva, LYRA3 TESCAN (Universidad de los Andes). A: Biofilm con un área de cobertura 132 μm , B: agregaciones de cocos y cristales de hidroxapatita en una cobertura de 29.6 μm , C: cadena de cocos, acercamiento a 17.3 μm , D: acercamiento de cadena de cocos a 6.92 μm .

10. DISCUSIÓN

En este estudio se desarrollaron biopelículas sobre láminas de esmalte con y sin tratamiento de saliva. Basados en modelos de colonización espaciotemporal, la población bacteriana en la cavidad oral se ha dividido en colonizadores tempranos, intermedios y tardíos; algunos autores que han trabajado con biopelículas orales multiespecíficas han usado entre tres y seis especies (Blanc 2014).

En este trabajo se formaron biopelículas con 6 especies bacterianas diferentes entre colonizadores tempranos, intermedios y tardíos del biofilm en orden de colonización, las especies incluidas fueron *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

Se pudo evidenciar que hubo mayor formación de biopelícula en las láminas de esmalte humano y/o de vidrio sin tratamiento de saliva comparado con las láminas pretratadas con saliva, estos datos fueron reproducibles y comparables entre la microscopia electrónica de barrido y los ensayos de viabilidad evaluados por microscopia de fluorescencia, así como también con los ensayos cualitativos de cristal violeta. Palmer et al., 2011, reportaron en un modelo de biofilm multiespecies sobre láminas de vidrio que, especies de *Streptococcus* y *Actinomyces* tenían propiedades y características de unión diferentes en las placas de vidrio sin tratamiento con saliva que las tratadas o acondicionadas con saliva humana. En el caso de *S. oralis*, se unió mejor al vidrio sin tratamiento de saliva, lo que se podría deberse a su pobre capacidad de interacción con proteínas salivales como la alfa-amilasa (Palmer 2011).

Se ha demostrado que las concentraciones de proteínas salivales tienen una influencia importante en la cinética de la formación de biopelículas *in vitro* principalmente por efectos de la fuerza iónica, el pH y ciertas características del sustrato (Vassilakos 1992).

Al observar los resultados de microscopia de fluorescencia se evidencia que en la biopelícula sobre láminas de vidrio pretratadas con saliva las bacterias se disponen en pequeños clusters dispersos sobre toda la superficie, por el contrario, en la biopelícula

sobre láminas, sin pretratamiento con saliva se observan las bacterias cubriendo mayor área de superficie. Tradicionalmente se ha documentado que la saliva es una condición favorable para la formación de biofilm, lo anterior debido a que las biopelículas en condiciones favorables deben mantener un equilibrio entre el aporte de nutrientes proporcionado por la saliva y el medio ambiente para mantener su estructura; mientras que el mantenimiento en condiciones desfavorables puede afectar la estructura de la biopelícula retrocediéndola a estadios anteriores como lo menciona en su estudio Serrano GJ et al., 2005. Sin embargo, en nuestro trabajo no se evidenció un efecto favorable del acondicionamiento con saliva sobre la formación de biofilm, la estructura y viabilidad. No cambios importantes en la viabilidad bacteriana entre biopelículas formadas sobre láminas de vidrio con o sin pre-tratamiento de saliva.

En la microscopia de epifluorescencia en el biofilm formado sobre láminas de vidrio se observan clusters en contacto cercano, lo cual se ha descrito como la forma más común de colonización inicial de la biopelícula (Díaz 2006), con agrupaciones típicas de formación de biofilm, sin embargo, no ocupan por completo el área de la superficie. Lo anterior se debe, a que las bacterias que se unen inicialmente pueden establecerse y predominar con éxito solo en los últimos tiempos de colonización (Díaz 2006).

El éxito de ciertas especies bacterianas dentro de la biopelícula podría estar condicionado a interacciones con otras bacterias presentes en la misma comunidad por lo tanto la mayor proporción bacterias que se puede observar en la microscopía son los *Streptococcus*, ya que estos exhiben una extensa coagregación intergenérica, poseen numerosas adhesinas y actúan como una superficie naciente para el reconocimiento y unión de otros microorganismos (Sarduy 2016)

En cuanto a la estructura tridimensional y conformación del biofilm mediante microscopia electrónica de barrido, se pudo confirmar la presencia de una biopelícula inmadura. La cual se observa una conformación estructurada en las láminas de esmalte sin acondicionamiento de saliva.

Los estudios *in vivo* sobre el desarrollo de la placa han demostrado que los *Streptococcus* son los colonizadores predominantes, alcanzan el 60% del total después de 4 horas y hasta el 90% después de 8 horas de formación de placa (Kommerein 2017). En este estudio las microscopias evidencian las morfologías de cocos predominantes en las diferentes áreas de superficie evaluadas.

Bermejo P. *et al.* 2019, reportaron que en biopelículas formadas sobre implantes dentales, se observa un patrón similar de formación de biofilm, en el cual las primeras biopelículas no cubren uniformemente la superficie total del implante, se observan células bacterianas dispersas adheridas a toda la superficie como agregados multicelulares. Cuando las biopelículas maduran algo más, crecen en volumen y adquieren la morfología típica de la biopelícula que representa las comunidades bacterianas con canales entremezclados (Bermejo 2019).

Con el uso de SEM se pudo evaluar la morfología tridimensional de la biopelícula. A medida que la biopelícula madura, las comunidades microbianas forman estructuras en forma de pilas, cubiertas con matriz extracelular con amplios canales intercalados (Bermejo 2019).

11. CONCLUSIONES

Se formaron biopelículas orales multiespecies periodontales con 6 bacterias entre colonizadores tempranos y tardíos sobre láminas de vidrio y esmalte humano con un porcentaje de viabilidad mayor al 50%. El acondicionamiento del esmalte y de las láminas de vidrio con saliva no favoreció cambios importantes en la viabilidad del biofilm.

12. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se realizó una fase inicial de estandarización de una biopelícula multiespecies en orden de colonización sobre esmalte humano acondicionado con saliva comparado con esmalte sin tratamiento de saliva. Para validación posterior de la biopelícula y empleo de la misma para determinación de eficacia de sustancia antimicrobiana se sugiere continuar con esta línea de investigación enfocada a realizar seguimiento de la formación de biofilm a 14 días y un mes, para lograr una biopelícula madura.

En perspectiva se espera confirmar por análisis moleculares como FISH, marcando cada bacteria para determinar coagregaciones específicas e interacciones microbianas. Así mismo se sugiere la determinación que la expresión génica de marcadores importantes en formación de biofilm como moléculas auto inductoras. Principalmente determinación de cambios en la expresión del gen *LuxS*.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ábalos C. Adhesión bacteriana a biomateriales. *Av. Odontoestomatol* 2005; 21-(1): 347-353.
2. Absolom, DR: The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Canadian J Microbiol* 1988; 34-(3): 287-98.
3. Ammann TW, Bostanci N, Belibasakis GN, Thurnheer T. Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodont Res* 2013; 48-(4): 517-526.
4. Bermejo P , Sánchez MC , Llama-Palacios A , Figuero E , Herrera D , Sanz M. Topographic characterization of multispecies biofilms growing on dental implant surfaces: An in vitro model. 2019; 30-(3): 229-241.
5. Bernardi G, Giro MG, Gaillard C. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite: some new development. *Biochim Biophys Acta* 1968; 160-(3): 409-420.
6. Blanc V, Isabal S, Sánchez MC, Llama A, Herrera D, Sanz M, León R. Characterization and application of a flow system for in vitro multispecies oral biofilm formation. *J Periodont Res* 2013; 33-(2): 1-10.
7. Busscher H, Van der Mei H. Physicochemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* 1997; 11-(1): 24-32.
8. Castillo DM, Castillo Y, Delgadillo NA, Neuta Y, Jola J, Calderón J et al. Viability and Effects on Bacterial Proteins by Oral Rinses with Hypochlorous Acid as Active Ingredient. *Braz. Dent. J* 2015; 26-(5): 519-524.
9. China Meneses EM, de la Rosa Samper H, Morales Aguiar DR. Etiología y patogenia de las enfermedades periodontales agudas y crónicas. En: Colectivo de autores. *Compendio de Periodoncia*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2006. 5-(1): 55-166.

10. David R. Drake, Paul J, Keller J. Primary Bacterial Colonization of Implant Surfaces. The international journal of oral & maxillofacial implants 1999; 14-(2):226–232.
11. Díaz Caballero A, Vivas Reyes R, Puerta Llerena L, Ahumado Monterrosa M, Cabrales Salgado R, Cabrales Salgado R, et al. Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* y su relación con la expresión de *quorum sensing*. Rev Cubana Estomatol. 2010; 47-(4): 404-416.
12. Diaz PI, Charmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer JR, Kolenbrander PE. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. Appl Environ Microbiol. 2006; 72-(4): 2837-48.
13. Díaz Zuñiga J. *et al.*, Virulence and variability on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their association to periodontitis. 2012; 5-(1): 40-45.
14. Einspahr HM, Bugg CE. Esmalte-apatita y caries: estudio cristalográfico. En: Bases biológicas de la caries dental. Eds. Menaker I, Mohart RE, Navia JM. Salvat, Barcelona, 1986; 27-(1)-203-219.
15. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI: Strain of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. Infect Immun 1986; 52-(2): 555-61.
16. Guggenheim M, Shapiro S, Gmür R, Guggenheim B. Spatial Arrangements and Associative Behavior of Species in an In Vitro Oral Biofilm Model. Applied and Environmental Microbiology 2001; 67-(3):1343-1350.
17. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat Rev Immunol 2015; 15-(1):30–44
18. Hernández AA, Aránzazu GC. Características Y Propiedades Físicoquímicas De La Saliva: Una Revisión. Ustasalud 2012; 11-(1): 101–111
19. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, and Maeda V. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. J Dent Res 2009; 88-(11):982-990.
20. Hu, XL, Ho, B, Lim, CT, Hsu, CS. Thermal treatments modulate bacterial adhesion to dental enamel. J Dent Res 2011; 90-(12):1451–1456.

21. Jafer M, Patil S, Hosmani J, Bhandi SH, Chalisserry EP, Anil S. Chemical Plaque Control Strategies in the Prevention of Biofilm-associated Oral Diseases. *J Contemp Dent Pract* 2016; 17-(4):337-43.
22. Jaffar N, Miyazaki T, Maeda T. Biofilm Formation of Periodontal Pathogens on Hydroxyapatite surfaces: Implications for Periodontium Damage. *J Biomed Mater Res A* 2016; 104-(11):2873-80.
23. Jang Y, Sim J, Kyoung H, Kyu Choi B. Differential effect of autoinducer 2 of *Fusobacterium nucleatum* on oral streptococci. *Archives of oral biology* 2013; 58-(11): 1594-1602.
24. Kommerein N, Stumpp SN, Mußken M, Ehlert N, Winkel A, Haßsler S, et al. An oral multispecies biofilm model for high content screening applications. *PLoS ONE* 2017; 12-(3): e0173973.
25. Kuboniwa M, Lamont R. Subgingival biofilm formation. *Periodontol* 2000. 2010; 52-(1): 38-52.
26. Lafaurie GI, Calderón, J, Zaror, C, Millán, LV & Castillo DM. Ácido hipocloroso: una nueva alternativa como agente antimicrobiano y para la proliferación celular para uso en odontología. *Int. J. Odontostomat* 2015; 9-(3):475-481.
27. Lafaurie GI, Rosario AM, Arboleda S, Escalante A, Castillo DM, Millán LV, et al. Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología* 2009; 1-(1):3-11.
28. Lakhyani R, Wagdargi S. Saliva and its importance in complete denture prosthodontics. *National Journal of Integrated Research in Medicine* 2012; 1-(3): 139-146.
29. Lamkin M, Arancillo A, Oppenheim FG. Temporal and compositional characteristics of the salivary protein adsorption to hydroxyapatite. *J Dent Res* 1996; 75-(2): 803-808.
30. Li K, Bihan M, Yooseph S, Methe, BA. Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome. *PLoS ONE* 2012; 7-(6). e32118.
31. Palmer JR, Kazmezark K, Hansen MC, Kolenbrander PE. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. *Infect Immun.* 2001; 69-(9): 5794-804.

32. Papone, Virginia *et al.*, Detección y Prevalencia de Patógenos Periodontales de una Población con Periodontitis Crónica en Uruguay Mediante Metodología Convencional y Metagenómica. *Odontoestomatología*. 2015; 17-(25): 23-32.
33. Quintero AJ, Prada P, Inostroza CM, Chaparro A, Sanz AF, Ramírez VL, *et al.* Presencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el biofilm subgingival de pacientes diabéticos tipo 2: estudio transversal. *Rev Clín Periodoncia Implantol Rehabil Oral*, 2011; 4-(2): 54-58.
34. Robert J. Palmer JR, Karen Kazmerzak, Martin C. Hansen, Paul E. Kolenbrander. Mutualism versus Independence: Strategies of Mixed-Species Oral Biofilms In Vitro Using Saliva as the Sole Nutrient Source. *Infection and Immunity* 2001; 69-(9): 5794-5804.
35. Sacarano A., Piatelli M., Caputi S., Favero G.A., Piatelli A. Bacterial adhesión on commercial pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J. Periodontol.* 2004; 75-(2): 292-296
36. Salinas MF, Sánchez R, Salinas M, Vargas LE. Diferencias estructurales entre la Hidroxiapatita biogénica y sintética determinadas por técnicas fisicoquímicas. *Rev Sanid Milit Mex* 2004; 58-(1): 24-29.
37. Sarduy Bermúdez Lázaro & González Díaz María Elena. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica* 2016; 20-(3):167-175.
38. Serrano Granger Jorge, Herrera David. Dental Plaque as a Biofilm. How to eliminate it? *RCOE*; 2005; 10-(4): 431-439
39. Sherry L, Lappin G, O'Donnell LE, Millhouse E, Millington OR, Bradshaw DJ, *et al.* Viable Compositional Analysis of an Eleven Species Oral Polymicrobial Biofilm. *Front Microbiol* 2016; 7-(10):912.
40. Socrasnyk SS., *et al.* Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb; 25-(2):134-44.
41. Troncoso Mujica., *et al.* Co- Detection of Periodontal Pathogens in Chilean Patients with Chromatic Periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral.* 2010; 3-(3); 118-122.

42. Van Leeuwen MP, Slot DE, Van der Weijden, GA, Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J. Periodontol* 2011; 82-(1):174-94.
43. Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouth rinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J. Clin. Periodontol* 2012; 39-(11): 1042-1055.
44. Vassilakos N , Arnebrant T , Glantz PO . Adsorption of whole saliva onto hydrophilic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH. *Scand J Dent Res*. 1992 Dec; 100-(6): 346-53.
45. Wang S, Ge Y, Zhou X, Xu H, Weir M, Zhang K, *et al.* Effect of anti-biofilm glass-ionomer cement on *Streptococcus mutans* biofilms. *Int J Oral Sci*. 2016; 8-(2):76-83.
46. Wang Z, De la Fuente C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. *PLoS ONE*. 2015; 10-(7): 1-16.
47. Young A, Smistad G, Karlsen J, Rölla G, Rykke M. Zeta Potentials of Human Enamel and Hydroxyapatite as Measured by the Coulter® DELSA 440. *Advances in Dental Research* 1997; 11-(4): 560-565.
48. Zijng V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, et al. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PLoS ONE* 2010; 5-(2): 9321

14. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES
FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Parte 1: Información acerca de la Investigación.

➤ TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN

Evaluación de la eficacia del ácido hipocloroso como agente antiplaca en la formación de un modelo de biopelícula oral multiespecie *in vitro*

➤ NÚMERO DE PROTOCOLO

➤ NOMBRE DEL PATROCINADOR

Aquilabs U.S; Universidad El Bosque

➤ NOMBRE DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Gloria Inés Lafaurie Villamil

➤ INTRODUCCIÓN

La microbiota de la cavidad oral (microorganismos que viven en la boca) es diversa y desempeña papeles importantes en el mantenimiento de la salud oral. Estos organismos, crecen en forma de placa dental o biopelícula, también denominada sarro. Cuando no existe un apropiado cepillado dental y en general no hay una buena higiene oral, se favorece la aparición de enfermedades bucales, tales como la caries dental, gingivitis (inflamación de las encías) y periodontitis (enfermedad que cursa con sangrado de las encías, movilidad de los dientes y hasta pérdida de los dientes).

Por lo explicado anteriormente, es importante evaluar sustancias químicas que ayuden a complementar (NO reemplazar) el cepillado dental para el control de la formación de sarro. En este estudio se investiga una nueva sustancia denominada ácido hipocloroso para control de la formación de biopelícula o sarro.

➤ ¿PORQUE SE ESTA HACIENDO ESTA INVESTIGACIÓN?

PROPÓSITO

Esta investigación se realiza, porque ya se conoce por estudios previos en el instituto UIBO (lugar donde se realizará esta investigación) que el ácido hipocloroso tiene un buen efecto sobre bacterias que crecen en suspensión (por ejemplo las bacterias de la saliva) pero no se sabe si su efecto es bueno en bacterias que crecen en forma de biopelícula o sarro (es decir pegadas a los dientes), ya que son dos condiciones diferentes de vida para estos microorganismos y cuando las bacterias crecen en forma de biopelícula (pegadas a los dientes) son más resistentes a la acción de sustancias como los enjuagues bucales.

➤ ¿EN QUE CONSISTE ESTA INVESTIGACIÓN?

Para este estudio se tomarán un total de 50 dientes premolares inferiores permanentes obtenidos de diferentes individuos mayores de edad que acepten mediante la firma de un consentimiento informado donar estos dientes que han sido indicados por su odontólogo para extracción por colocación de ortodoncia. Estos dientes no deben tener caries, ni tratamiento de endodoncia (tratamiento de conducto) y deben estar indicados para extracción con fines de colocación de ortodoncia.

-Obtención de discos de esmalte

Se obtendrán discos de esmalte y dentina a partir del/los diente(s) recién extraídos, que usted como individuo mayor de edad acepte donar, debido a que este es un desecho biológico que no tiene ninguna utilidad para usted como persona y que será de gran importancia para el desarrollo de esta investigación. Es importante aclarar que si usted es un menor de edad no podrá participar en este estudio así tenga permiso de su familiar o acudiente.

PROTOCOLO CLÍNICO

Se utilizarán bacterias de la boca como *Streptococcus sanguinis* ATCC: 10556, *Streptococcus oralis* ATCC: 35037, *Streptococcus mutans* ATCC: 25175, *Actinomyces israelii* ATCC: 12012, *Fusobacterium nucleatum* ATCC: 25586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC: 33277 que son disponibles comercialmente y se formará una biopelícula o sarro en el laboratorio con estas

bacterias y los discos de esmalte que se sacarán de los dientes que usted acepte donar para esta investigación.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Aceptar participar en este estudio mediante su firma, en este consentimiento informado que usted está leyendo.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Dientes con caries

Diente que tenga tratamiento de conducto

Diente que NO hayan sido indicados para extracción (sacar) con fines de colocación de ortodoncia.

➤ ¿QUE TENGO QUE HACER SI PARTICIPO EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Si usted desea participar en esta investigación, solamente deberá donar el o los dientes a los cuales su Odontólogo le ha indicado que debe sacar para poder colocarle ortodoncia. Estos dientes deben ser premolares inferiores permanentes.

➤ ¿CUANTAS PERSONAS PARTICIPARÁN EN ESTA INVESTIGACIÓN?

No participarán personas directamente, porque este estudio no será realizado en humanos si no que se utilizará un desecho biológico, que serán dientes premolares inferiores permanentes obtenidos de pacientes que acepten participar en este estudio mediante la firma de un consentimiento informado.

➤ ¿CUANTO TIEMPO ESTARE EN ESTA INVESTIGACIÓN?

No se requerirá que usted como paciente este durante el transcurso de la investigación ya que, a partir de una sola extracción dental, se utilizarán estos dientes para obtener la muestra de esmalte requerida en esta investigación.

➤ ¿PUEDO RETIRARME DE LA INVESTIGACIÓN DE MANERA VOLUNTARIA EN CUALQUIER MOMENTO?

Usted no tiene por qué participar en esta investigación si no desea hacerlo y el negarse a participar no le afectará en ninguna forma a que sea tratado en esta clínica. Usted todavía tendrá todos los beneficios que de otra forma tendría en esta clínica. Puede dejar de participar en la investigación en cualquier momento que desee sin perder sus derechos como paciente en la institución. Su tratamiento en la clínica no será afectado en ninguna forma.

➤ ¿QUE PASA SI ME RETIRO DE LA INVESTIGACIÓN?

Usted tiene el derecho de retirarse de la investigación en cualquier momento que desee sin perder sus derechos como paciente de la clínica de la Universidad. Su tratamiento en la institución no será afectado de ninguna manera.

➤ ¿PORQUE PODRIA EL INVESTIGADOR PRINCIPAL RETIRARME DE LA INVESTIGACIÓN TEMPRANAMENTE?

Si cumple con los criterios de inclusión y exclusión la única manera que pueda ser excluido es, si su diente no cumple con las indicaciones de estar libre de caries, con formación radicular completa y sin antecedente de tratamiento endodóntico (tratamiento de conducto).

➤ ¿HAY RIESGOS RELACIONADOS CON EL EMBARAZO?

No se incluirán pacientes en embarazo en este estudio.

➤ ¿OBTENDRE ALGUN BENEFICIO AL PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Soy consciente que no recibiré ningún beneficio directo por la participación en esta investigación.

➤ ¿QUE BENEFICIOS OBTENDRA LA COMUNIDAD DE ESTA INVESTIGACIÓN?

El resultado de la investigación tiene aplicaciones potenciales a nivel de la Medicina periodontal, mediante la validación de una sustancia para el manejo de infecciones orales y en el campo académico y científico para el desarrollo de nuevas investigaciones.

➤ ¿QUE OTRAS OPCIONES TENGO ADEMÁS DE PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Si usted no desea tomar parte en la investigación, se le proporcionará el tratamiento estándar en uso, disponible en la clínica odontológica de la Universidad o en la práctica privada.

➤ ¿COMO SE VA A MANEJAR LA PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD DE MIS DATOS PERSONALES?

La información que recojamos en este proyecto de investigación se mantendrá confidencial (Ley de habeas data de 2012). La información acerca de usted que sea recogida durante la investigación, será puesta fuera del alcance y nadie sino los investigadores tendrán acceso a verla. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá la información encerrada en archivo con llave. No será compartida ni entregada a nadie con la excepción de que la Ley requiera la información.

➤ ¿QUE SUCEDERÍA SI NO SE RESPETA LA CONFIDENCIALIDAD DE MIS DATOS?

Toda la información del proyecto es confidencial. La información se manejará con números en lugar de nombres. El comité de ética vigilará de manera estricta que los protocolos de confidencialidad se cumplan adecuadamente.

➤ ¿MI PARTICIPACIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN IMPLICA QUE VOY A RECIBIR ALGUN TIPO DE TERAPIA?

Conozco que para esta investigación no implica ningún tipo de terapia que involucre mi condición de salud.

➤ ¿TIENE ALGUN COSTO MI PARTICIPACIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN?

La participación en la investigación no tiene ningún costo para usted. Sin embargo, los costos del procedimiento clínico de extracción de los dientes corren a su cargo.

➤ ¿RECIBIRÉ ALGUN TIPO DE COMPENSACIÓN O PAGO?

Usted NO recibirá ningún tipo de compensación o pago por participar en el estudio.

➤ ¿QUE PASA SI ME LESIONO O ME ENFERMO DURANTE LA INVESTIGACIÓN?

Usted tiene el derecho a retirarse en cualquier momento de la investigación.

- ¿CÓMO SE RESPONSABILIZARÁ EL INVESTIGADOR O LA INVESTIGACIÓN SI A MI COMO SUJETO DE INVESTIGACIÓN ME PASA ALGO MALO ASOCIADO A LA INVESTIGACIÓN?

Esta investigación no se realiza directamente con paciente, sino con un desecho biológico (dientes que ya han sido indicados para extracción) es un estudio completamente *in vitro* (en el laboratorio) no hay ningún riesgo asociado a la investigación.

- ¿TENDRE LA POSIBILIDAD Y COMO PODRE ACCEDER A LA INTERVENCIÓN O AL MEDICAMENTO CUYA EFECTIVIDAD SEA COMPROBADA?

No recibiré ningún medicamento.

- ¿CUALES SON MIS DERECHOS COMO SUJETO DE INVESTIGACIÓN?

Usted tiene el derecho a estar completamente informado y que sus preguntas sean respondidas a su completa satisfacción.

Tiene el derecho a retirarse en cualquier momento de la investigación

- ¿COMO Y EN QUE MOMENTO VOY A CONOCER LOS DATOS FINALES DE LA INVESTIGACIÓN?

El conocimiento que obtengamos por realizar esta investigación se compartirá con usted antes de que se haga disponible al público. No se compartirá información confidencial. Habrá encuentros en la comunidad y estos se anunciarán. Después de estos encuentros, se publicarán los resultados para que otras personas interesadas puedan aprender de nuestra investigación.

¿QUE HAGO SI TENGO ALGUNA PREGUNTA O PROBLEMA?

Si tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, incluso después de haber iniciado el estudio. Si desea hacer preguntas más tarde, puede contactar a:

- INFORMACIÓN DE CONTACTO DEL COMITÉ DE ÉTICA

comiteetica@unbosque.edu.co, Calle 132 No.7A-85.

- INFORMACIÓN DE CONTACTO DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Gloria Lafaurie Villamil, Directora Proyecto, Directora Grupo UIBO. Celular 313- 3337551.

Correo institutouibo@gmail.com

Diana Marcela Castillo, Asesora, coordinadora análisis Microbiológico. Celular 300- 2015997, correo castillodiana@unbosque.edu.co

Yormaris Castillo, Asesora, Investigadora del laboratorio de Microbiología oral -UIBO:
Celular 3002448538, correo castilloyormaris@unbosque.edu.co

Parte 2: Formulario de Firmas. He sido invitado(a) a participar en el estudio **“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL ACIDO HIPOCLOROSO COMO AGENTE ANTIPLACA EN LA FORMACIÓN DE UN MODELO DE BIOPELÍCULA ORAL MULTIESPECIE *IN VITRO*”.**

Entiendo que mi participación consistirá en donar mis dientes premolares inferiores permanentes, no cariados, sin antecedente de tratamiento endodóntico y con indicación de exodoncia con fines ortodónticos. He leído y entendido este documento de Consentimiento Informado o el mismo se me ha leído o explicado. Todas mis preguntas han sido contestadas claramente y he tenido el tiempo suficiente para pensar acerca de mi decisión. No tengo ninguna duda sobre mi participación, por lo que estoy de acuerdo en hacer parte de esta investigación. Cuando firme este documento de Consentimiento Informado recibiré una copia del mismo (partes 1 y 2).

Autorizo el uso y la divulgación de mi información a las entidades mencionadas en este Consentimiento Informado para los propósitos descritos anteriormente.

Acepto voluntariamente participar y sé que tengo el derecho de terminar mi participación en cualquier momento. Al firmar esta hoja de Consentimiento Informado no he renunciado a ninguno de mis derechos legales.

Nombre del Participante

Firma del Participante y Fecha

Tutor legal del Participante

Firma del Tutor legal y Fecha

Investigador principal

Firma del Investigador y Fecha

Nombre del Testigo (I)

Firma del Testigo (I) y Fecha

Nombre del Testigo (II)

Firma del Testigo (II) y Fecha

Anexo 2. Modelo y diseño experimental de formación de biopelícula

Fase I imagen (A-B): película adquirida y colonización primaria. Sobre láminas de esmalte, laminillas de vidrio y directo sobre pozos. Formación de biopelícula fase II (C)

