



Microorganismos asociados a periodontitis en sujetos atendidos en la clínica de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana para la formación de un modelo de biopelículas polimicrobianas *in vitro*

María Del Mar Bravo Becerra

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C

Microorganismos asociados a periodontitis en sujetos atendidos en la clínica de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana para la formación de un modelo de biopelículas polimicrobianas *in vitro*

María Bravo Becerra

María Del Mar Bravo Becerra
Estudiante de Bacteriología



Claudia Marcela Parra Giraldo, PhD
Directora

Mayra A. Téllez Corral

Mayra Alexandra Téllez Corral, M.Sc
Codirectora

Dabeiba A. García Robayo

Dabeiba Adriana García Robayo
Evaluador

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ D.C

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN #13 DE 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Agradecimientos

“Quiero dar en primera instancia gracias a Dios por cada una de las oportunidades que me ha brindado cada día durante mi formación como profesional, por guiarme y darme fortaleza en este proyecto tan significativo para mí. A mi madre Johana por su apoyo, paciencia, consejos en las dificultades que se me presentaron y por ser mi ejemplo de una personas fuerte y perseverante. A mis abuelos Manuel y Rosalba por su compañía siempre y guiarme a hacer lo correcto. A mis tíos Omar y Lucía por estar pendientes de mí. Y a mis hermanos Laura y Juan, porque ellos son mi mayor inspiración para seguir mis sueños y mejorar cada día, porque mis triunfos serán gracias a todos ustedes.

A mis compañeros de carrera por sus explicaciones cuando me encontraba perdida, a mis docentes de la Pontificia Universidad Javeriana, cuya difusión de conocimiento permitió mi crecimiento personal y profesional.

A la profesora Claudia Parra, por su confianza al permitirme hacer parte del semillero de Micosis Humanas y proteómica. Aunque tengo poca experiencia en investigación, mi crecimiento durante el desarrollo de este proyecto fue muy grande e importante para mí; por este motivo quiero agradecer especialmente a Mayra Téllez, por guiarme, por toda su paciencia, dedicación y ayuda al momento de solucionar dificultades. A las dos, gracias por ser esas docentes investigadoras que inspiran a sus estudiantes a seguir sus responsabilidades en esta maravillosa profesión“

Tabla de contenido	
1.Resumen	9
2. Introducción.....	10
4. Marco teórico.....	12
4.1. Biopelícula.....	12
4.1.1. Propiedades físicas y composición química:.....	12
4.1.2. Aspectos fisiológicos y regulatorios:	13
4.1.3. La formación de una biopelícula constituye las siguientes etapas(13):	13
4.2. Microorganismos presentes en la cavidad oral:.....	14
4.3. Enfermedades orales causadas por biopelículas.....	14
4.4. Periodontitis	15
4.4.1. Microorganismos causales de periodontitis.	16
4.4.2. Interacciones entre <i>Candida albicans</i> y bacterias periodontopatógenas.....	18
4.4.3. Etapas del desarrollo de una biopelícula causante de periodontitis.	20
4.4.4. Matriz extracelular.....	22
4.5. Técnicas metodológicas en el análisis de biopelículas.	23
4.5.1. Conteo Unidades Formadoras de Colonias: método de placa..	23
4.5.2. Desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI- TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry).....	23
4.5.3. Análisis de viabilidad celular con MTT.....	24
4.6. Antecedentes	25
5. Objetivos	26
5.1. General	26
5.2.Específicos.....	26
6. Metodología	26
7. Resultados	30
7.1. Conteo UFC/mL y frecuencia de microorganismos en muestras de sujetos con periodontitis y sujetos sanos/ gingivitis.....	30
7.1.1. Conteo de unidades formadoras de colonias.....	30
7.1.2. Frecuencia de microorganismos identificados en las muestras	31

7.2. Ensayo de viabilidad celular con MTT, conteo UFC/ml y frecuencia de microorganismos de las réplicas	32
7.2.1. Ensayo de viabilidad celular con MTT.....	32
7.2.2. Recuento UFC/mL de las replicas.....	33
7.2.3. Frecuencia de microorganismos identificados en las replicas.	34
7.2.4. Reidentificación de microorganismos recuperados antes y después de la formación de la biopelícula por réplicas representados en gráficas de tortas	36
8. Discusión	37
9. Conclusiones	41
10. Recomendaciones.....	41
11. Bibliografía.....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Complejos según Socransky de microorganismos causales de periodontitis en el margen subgingival
Tabla 2	Complementación de complejos según Socransky de microorganismos causales de periodontitis en el margen supragingival
Tabla 3	Microorganismos identificados en las muestras de sujetos con periodontitis en estudios previos al presente proyecto
Tabla 4	Resultados de estadística descriptiva UFC/mL de sujetos con periodontitis y sanos/gingivitis en muestras de saliva, placa subgingival y surco/bolsa
Tabla 5	Resultados de estadística descriptiva UFC/mL de las réplicas 2 y 3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquematación de las etapas de formación de una biopelícula
Figura 2	Modelo espaciotemporal de la colonización bacteriana oral.
Figura 3	Esquematación del procedimiento del recuento de UFC/mL en placa.
Figura 4.	Representación esquemática de un espectrómetro de masas MALDI-TOF.
Figura 5.	Reducción enzimática de MTT a formazán
Figura 6	Procedimiento para el conteo de UFC/mL y la identificación en MALDI-TOF en muestras de sujetos con periodontitis
Figura 7	Procedimiento para el conteo de UFC/mL y la identificación en MALDI-TOF en muestras de sujetos sanos/gingivitis
Figura 8	Procedimiento para la formación de una biopelícula de 96 horas y el ensayo de viabilidad microbiana con MTT
Figura 9	Frecuencia de Microorganismos en muestra de placa subgingival con dilución 10 ⁻³ en sujetos con periodontitis identificados por MALDI-TOF.
Figura 10	Frecuencia de Microorganismos en muestra de placa subgingival con dilución 10 ⁻³ en sujetos sanos/gingivitis identificadas por MALDI-TOF.

Figura 11	Ensayo de viabilidad celular de la biopelícula de 96 horas con MTT. La gráfica muestra los valores de la absorbancia a una onda de 490nm de las biopelículas con distintas cantidades de inóculo durante 4 momentos, a las 24, 48, 72 y 96 horas.
Figura 12	Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 2 de la biopelícula.
Figura 13	Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 2 de la biopelícula por horas
Figura 14	Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica de la biopelícula
Figura 15	Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 3 de la biopelícula por horas
Figura 16	Porcentaje de microorganismos identificados previos a la formación de la biopelícula: únicamente fue identificado en MALDI- TOF Streptococcus mutans
Figura 17	Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 2 de la biopelícula.
Figura 18	Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 3 de la biopelícula.

1. Resumen

La periodontitis es una enfermedad infecciosa inflamatoria crónica, frecuente a nivel mundial y nacional, causada por biopelículas polimicrobianas formadas principalmente por bacterias periodontopatógenas y hongos levaduriformes. Esta afección conlleva a severas consecuencias a nivel individual y su tratamiento se basa en terapia antibiótica frente un solo patógeno específicamente bacteriano o antibióticos de amplio espectro, además de un tratamiento mecánico, de tipo invasivo como el desbridamiento dental para la eliminación de estas biopelículas. Por esto, este trabajo será, a futuro, la base para la búsqueda y determinación de nuevas alternativas de tratamiento, que inhiban la formación de dichos consorcios organizados en biopelículas.

Establecido lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue describir los microorganismos asociados a periodontitis en sujetos atendidos en la clínica de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana para la formación de un modelo de biopelícula polimicrobiana *in vitro*. Para desarrollarlo, en primera instancia se realizó la elección de muestras pertenecientes al banco de trabajo del Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO), para su posterior cultivo en distintas diluciones por siembra masiva en agar sangre, tras 6 días de incubación a 37°C y en atmósfera de anaerobiosis se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias y la identificación de colonias utilizando MALDI-TOF. Seguido a esto, para la formación de la biopelícula de 96 h se preparó una suspensión microbiana a partir del cultivo de las tres muestras de un sujeto con periodontitis, para la inoculación de con 200 ul de la solución sin diluir y en distintas diluciones (Desde 10^{-1} a 10^{-6}), cada 24 h durante 4 días. Finalmente, se realizó el ensayo de viabilidad celular con sal de tetrazolio MTT, incubándolo a 37°C durante 1,5 horas en atmósfera de anaerobiosis, finalizado este tiempo se solubilizaron los cristales de formazán con DMSO y se realizó la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm, en un lector de Microplacas para Absorbancia ELx800.

Las UFC/mL contadas en las 3 muestras fueron analizadas por estadística descriptiva, teniendo en cuenta la media, desviación estándar, y coeficiente de variación. Acerca de los microorganismos identificados en los dos grupos de sujetos, corresponden en su mayoría a especies asociadas a los complejos amarillo y azul. Por su parte *C. albicans* no fue identificada en ninguna de las muestras de los sujetos. Los resultados de la viabilidad no muestran diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, la biopelícula de 72 h mostró mayor viabilidad en cada una de las cantidades de inóculo. Por último, el conteo de UFC/mL de las réplicas se analizó como se describió anteriormente; y los microorganismos recuperados e identificados en las réplicas corresponden en su mayoría a especies asociadas a los complejos amarillo y azul. No fue posible identificar bacterias asociadas al complejo rojo.

Se concluye que, a partir de la identificación de microorganismos en muestras de saliva, placa y surco gingival, se logró la recuperación de bacterias asociadas a los complejos amarillo, azul, y naranja. No se logró la recuperación de *C. albicans*, aunque esta se identificó en un primocultivo, posiblemente el agar utilizado para su recuperación favoreció el crecimiento de las bacterias y no de la levadura. Por otra parte, los microorganismos asociados al complejo rojo no fueron recuperados, posiblemente por la sensibilidad del método la cual no permite la recuperación de estos microorganismos asociados al complejo rojo. Además, la patogénesis de la periodontitis no recae únicamente en estos microorganismos asociados al complejo rojo si no que es problemática polimicrobiana que requiere estudios más profundos para establecer el rol de este consorcio microbiano. En cuanto al modelo de biopelícula polimicrobiano establecido en este estudio para la formación de una biopelícula a partir de microorganismos salvajes, nos evidencia que aquellos microorganismos que mayor adaptabilidad presentaron en el desarrollo de la biopelícula son aquellos asociados al complejo amarillo. Por último, se requieren 72 h del cultivo polimicrobiano para la recuperación y adaptabilidad al microambiente de diversos microorganismos asociados a los complejos amarillos, naranja, y azul.

Palabras claves: Placa Dental, Periodontitis, Biopelícula, Viabilidad.

2. Introducción

La periodontitis, es la undécima afección médica más frecuente de 328 enfermedades investigadas para el estudio Mundial de Carga de Morbilidad en el año 2016 (1). Es inducida por biopelículas y caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes (periodonto), debido a una respuesta inflamatoria local crónica excesiva de los tejidos, conduciendo eventualmente a la pérdida de dientes(2) Debido a que su tratamiento es mecánico e invasivo para el sujeto, y la terapia antibiótica no es específica ante biopelículas, es importante evaluar la frecuencia de distintos microorganismos que componen la biopelícula, y con esto a futuro permitir el estudio y hallazgo de nuevas alternativas de tratamiento, que inhiban la formación de biopelículas subgingivales causales de periodontitis.

Teniendo en cuenta lo anterior, para evaluar los microorganismos asociados a periodontitis en sujetos atendidos en la clínica de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana para la formación de un modelo de biopelícula polimicrobiana *in vitro*, se desarrolló una metodología basada en la elección de muestras pertenecientes al banco de trabajo del Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO), el cultivo de estas para su identificación utilizando MALDI-TOF y el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC/mL), en la formación de una biopelícula de 96 h a partir de una suspensión microbiana que contenía microorganismos de las 3 muestras estudiadas de un sujeto con periodontitis y su posterior análisis de la viabilidad de la biopelícula por medio de un ensayo con sal de tetrazolio MTT y el recuento y la identificación de los microorganismos recuperados tras disgregar las biopelículas.

3. Justificación y planteamiento del problema

De acuerdo con la OMS las enfermedades bucodentales afectan alrededor de 3500 millones de personas en el mundo. Entre estas enfermedades se encuentran la micosis pseudomembranosa, caries dentales, periimplantitis y periodontitis(3). La periodontitis, es la undécima afección médica más frecuente de 328 enfermedades investigadas para el estudio Mundial de Carga de Morbilidad en el año 2016 (1). Entre tanto, en Colombia, se realizó una encuesta a 20493 colombianos en la cual se encontró que el 61.8% de la población evidencia periodontitis en sus diferentes grados de severidad, siendo la segunda condición de interés en salud bucal entre la población adulta (4).

Las biopelículas orales polimicrobianas son formadas por bacterias y levaduras(5), que se unen a las superficies de los tejidos duros y blandos en la boca(6). La placa dental es una biopelícula compleja compuesta por un consorcio de múltiples especies(7) que al causar infección en los tejidos periodontales generan una reacción inflamatoria, causando enfermedades inflamatorias crónicas como la periodontitis(8), cuya consecuencia es la pérdida del soporte dental. La periodontitis se presenta comúnmente en adultos de mediana edad y aumenta en personas de edad avanzada (9). A nivel individual, la consecuencia de estas afecciones reducen la calidad de vida de las personas, ya que causa pérdida de piezas dentales, discapacidad, disfunción masticatoria y como resultado un estado nutricional deficiente (10). Incluso, la periodontitis se ha asociado a enfermedades sistémicas como enfermedad cardiovascular y diabetes (11) presumiendo que la diseminación de microorganismos y sus productos de la placa dental y los mediadores inflamatorios de los tejidos periodontales a otros órganos del cuerpo son las causa presumibles de esta conexión entre las enfermedades periodontales y sistémicas(12)

La importancia de realizar la evaluación de los microorganismos asociados a la periodontitis en sujetos radica en permitir la identificación y posteriormente el análisis de la frecuencia de estos microorganismos periodontopatógenos o de microorganismos atípicos, es decir, aquellos que no están asociados a los complejos de Socransky. Adicionalmente, tras el análisis de la frecuencia, es relevante realizar modelos de biopelículas polimicrobianas teniendo en cuenta las interacciones sinérgicas entre bacterias periodontopatógenas y hongos levaduriformes como *C. albicans*. Estas biopelículas serán la base para la búsqueda y determinación de nuevas alternativas de tratamiento, que inhiban la formación dichos consorcios, organizados en biopelículas, las cuales no son fácilmente susceptibles a los antibióticos utilizados tradicionalmente en el tratamiento de dichas patologías, puesto que las propiedades físicas y biológicas como los factores genéticos y moleculares microbianos son elementos que en su interacción protegen la biopelícula de estos tratamientos, además, estos son dirigidos principalmente a un solo patógeno específicamente bacteriano o se utilizan antibióticos de amplio espectro, otra estrategia es un tratamiento mecánico, de tipo invasivo como el desbridamiento dental para la eliminación de

estas biopelículas(13). Dicho lo anterior, no hay tratamiento dirigido a biopelículas orales que tengan en su composición hongos como *C. albicans* o dirigidos a biopelículas polimicrobianas, por este motivo se espera que a futuro este estudio sirva para la evaluación de tratamientos eficaces frente a biopelículas polimicrobianas.

Es así que al tener establecido que la periodontitis es una enfermedad infecciosa inflamatoria crónica causada por biopelículas polimicrobianas en el margen subgingival, es de gran importancia evaluar la frecuencia de esos microorganismos y la posterior realización de un modelo de biopelícula polimicrobiano *in vitro* constituidas con *C. albicans* y bacterias periodontopatógenas y atípicas, originada en la placa subgingival de sujetos con periodontitis, ya que servirá en un futuro para la realización de modelos de biopelículas estables y reproducibles las cuales servirán en la evaluación de posibles sustancias antimicrobianas capaces de inhibir la formación de dichas biopelículas.

4. Marco teórico

4.1. Biopelícula

Las biopelículas polimicrobianas pueden definirse como una colección variada de microorganismos principalmente bacterias y hongos, que existen en una interfaz de fase o densidad y están embebidos en una matriz hidratada propia y/o derivada del hospedero, que a menudo consta de polisacáridos (14). Las biopelículas polimicrobianas relacionadas con las enfermedades infecciosas orales son frecuentes en los seres humanos.

En general, las biopelículas presentan las siguientes características (13):

4.1.1. Propiedades físicas y composición química:

- Adherencia: tanto a materiales superficiales como a superficies bióticas, por medio de interacciones adhesina bacteriana-receptor del hospedero y mecanismos de adhesión no específicos como las fuerzas hidrófobas o electrostáticas.
- Matriz de sustancia polimérica extracelular: compuesta por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y depende del tipo y abundancia de nutrientes, hidrodinámica, temperatura, concentración de oxígeno. Proporciona soporte y protección a la biopelícula.
- Arquitectura: hay distintas formas que dependen de la madurez, composición y condiciones de crecimiento de la biopelícula, entre estas formas están los parches planos, montículos, setas, torres, ondulaciones, serpentinadas.
- Viscoelasticidad: Evita el desprendimiento de la biopelícula, confiriéndole fluidez y la capacidad de recuperar la forma tras una perturbación.
- Heterogeneidad: en cuanto a distribución, estructura, fisiología, tamaño, forma y microambiente que modula la actividad microbiana.

4.1.2. Aspectos fisiológicos y regulatorios:

- Ciclo de vida del desarrollo: Estudios previos de la adhesión, crecimiento, maduración y dispersión de microorganismos que componen la biopelícula. Sin embargo, se desconocen estas fases en otros microorganismos al igual que los sistemas de señalización, sólo se conoce las estructuras superficiales adecuadas a la adhesión.
- Señales celulares difusibles: coordinan el comportamiento de la población, la actividad metabólica, la formación y dispersión de biopelículas.
- Formación alterada de microambientes: La actividad metabólica confiere el desarrollo de gradientes en nutrientes, pH y oxígeno y la difusión de moléculas dentro y fuera de la biopelícula.
- Subpoblaciones inactivas o de crecimiento lento: Debido a la tolerancia a antibióticos o el agotamiento de nutrientes que induce a una fase estacionaria.

4.1.3. La formación de una biopelícula constituye las siguientes etapas(13):

- a. Adhesión inicial: los microorganismos se unen a las superficies del dispositivo médico o del hospedero a través de adhesinas asociadas a la superficie celular.
- b. Formación temprano: los microorganismos comienzan a dividirse y producir EPS que mejora la adhesión, mientras que forman la matriz que incrusta las células.
- c. Biopelícula madura: desarrollo de las estructuras 3D, la matriz de exopolisacárido (EPS) proporciona un andamio multifuncional y protector que permite que se formen microambientes químicos y físicos heterogéneos. Entre los microorganismos se establecen interacciones polimicrobianas y sociales (competitivas y sinérgicas).
- d. Dispersión: las células abandonan la biopelícula para volver a entrar en la fase planctónica.

A continuación, en la Figura 1 (15) se muestra esquemáticamente el proceso de la formación de biopelículas, anteriormente mencionado.

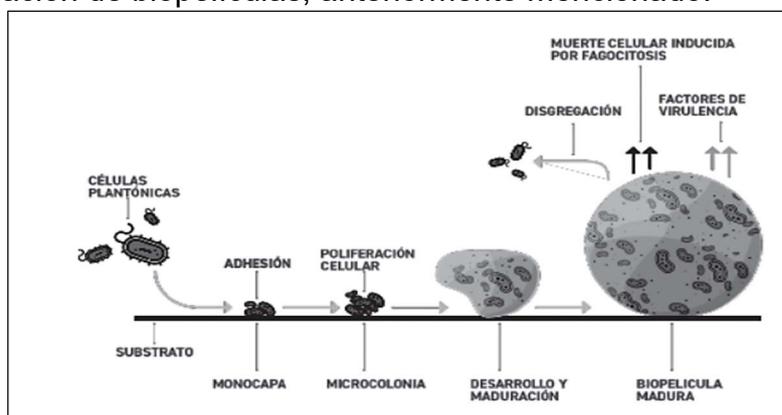


Figura 1. Esquemización de las etapas de formación de una biopelícula

4.2. Microorganismos presentes en la cavidad oral:

En la cavidad oral de los seres humanos, se encuentran biopelículas orales polimicrobianas adheridas a diferentes superficies bucales, que provocan enfermedades (16). Aproximadamente 700 especies bacterianas orales podrían aislarse y cultivarse *in vitro*, de las cuales aproximadamente 100 cepas bacterianas son cultivables en la cavidad oral (17). Por otra parte, se conoce que la cavidad oral también alberga más de 100 especies de hongos(18). Algunos de los microorganismos en la cavidad oral son:

Bacterias: *Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella párvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (19). De igual manera se pueden encontrar bacterias como *Fusobacterium necrophorum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, entre otros(20).

Hongos: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida zeylanoide*, *Candida lusitaniae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, y *Kluyveromyces lacti* (21). Además en la cavidad oral también se han encontrado especies de hongos como *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Cryptococcus*(22). En otro estudio se encontraron como hongos cultivables una variedad de mohos principalmente *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., y *Cladosporium* spp. y levadura especialmente *Candida* spp. y *Rhodotorula* spp. (23)

4.3. Enfermedades orales causadas por biopelículas.

El ecosistema oral tiene varios nichos que incluyen saliva, superficies de tejido blando de la mucosa oral y lengua y superficies de tejido duro de los dientes; cada una de estas proporciona condiciones óptimas y nutrientes para los microorganismos colonizadores(24)

Saliva: los microorganismos provienen principalmente de desprendimientos de biopelículas en la cavidad bucal (24) Por otra parte, la saliva forma una película salival en la superficie del diente, que es una película acondicionadora que facilita la adhesión bacteriana (25).

Placa dental: es una biopelícula organizada estructural y funcionalmente construida sobre las superficies de los dientes (24) La placa dental se divide en placa supragingival, asociado generalmente con la caries dental ya que se forma sobre superficies de esmalte expuestas y subgingival, correspondiente a la placa debajo de la línea de las encías dentro de la bolsa o surco periodontal, asociada con enfermedades periodontales (26)

Entre las enfermedades orales causadas por biopelículas bacterianas o fúngico bacterianas, encontramos: la caries, producida por una placa dental definida como la comunidad microbiana diversa que se encuentra en la superficie del

diente embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival(27). Además de la caries dental hay otras enfermedades causadas por biopelículas como infecciones endodónticas que es la progresión de la caries dental al punto de colonizar la pulpa, la gingivitis que consiste en una inflamación de las encías causada por placa bacteriana en el margen gingival y la periodontitis progresión destructiva irreversible de la gingivitis (8). La periimplantitis, es un proceso infeccioso, inflamatorio y destructivo, similar a la periodontitis, ocurre después de la osteointegración de un implante (28). Por otro lado, las biopelículas en la cavidad oral formadas por *Candida albicans* son causales de enfermedades infecciosas como la candidiasis oral, sea hiperplásica o eritematosa, candidiasis pseudomembranosa y queilitis angular(8).

4.4. Periodontitis

La periodontitis es una de las enfermedades inflamatorias infecciosas más comunes en los seres humanos. Es inducida por biopelículas y caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes (periodonto), debido a una respuesta inflamatoria local crónica excesiva de los tejidos, conduciendo eventualmente a la pérdida de dientes(2). El proceso infeccioso se da tras la colonización bacteriana en los dientes y encías, formando biopelículas polimicrobianas supragingivales (Este nicho es principalmente aeróbico, ya que las bacterias adherentes están directamente expuestas a la atmósfera abierta de la cavidad bucal). Si no se eliminan las biopelículas de la superficie del diente mediante una higiene bucal adecuada, se producirá un crecimiento por debajo del margen gingival, por lo que se vuelven “subgingivales” e interactúan con el epitelio de la bolsa periodontal yuxtapuesta(29). Este crecimiento por debajo del margen gingival se deben a la alteración del microambiente por parte de la biopelícula supragingival, por encima de las encías, conduciendo a un pH y redox más bajo, permitiendo a microorganismos capnófilo y anaerobios colonizar y producir biopelículas (30).

Las biopelículas dentales forman parte de la microbiota oral, son beneficiosa para el huésped al proporcionar resistencia a la colonización contra microorganismos/patógenos exógenos e interactuar con el sistema inmunitario a un nivel compatible con la salud manteniendo un equilibrio denominado una homeostasis microbiana(31).La periodontitis es asociada con la disbiosis (desequilibrio de la microbiota) la cual depende en gran medida de interacciones cooperativas y competitivas entre microorganismos orales durante la formación de la comunidad de biopelículas patógenas en los sitios gingivales. Los factores de estrés pueden ser de diferente naturaleza, como cambios en la dieta o los hábitos de higiene oral, tratamiento médico, por ejemplo, antibióticos o medicamentos que influyen en el flujo salival, o un cambio en la respuesta del huésped debido a la medicación o una enfermedad inmunosupresora(31). Los patobiontes orales son los patógenos oportunistas que viven como comensales en huéspedes sanos pero que pueden causar enfermedades en huéspedes susceptibles; en el desarrollo de la periodontitis desempeñan papeles diferentes

y sinérgicos, dependiendo de sus actividades inmunoestimuladoras y dañinas para el hospedero (32). Debido a esto, los síntomas de la enfermedad incluyen inflamación del tejido de las encías, sangrado de las encías, recesión gingival, formación de bolsas profundas entre la encía y la superficie del diente y dientes flojos (14).

4.4.1. Microorganismos causales de periodontitis.

4.4.1.1. Bacterias

En 1998 Socransky y colaboradores demostraron las asociaciones de los microorganismos causales de la periodontitis en el margen subgingival y categorizaron en complejos agrupado en colores(33):

Tabla 1. Complejos según Socransky de microorganismos causales de periodontitis en el margen subgingival

Complejo Amarillo	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , y <i>Streptococcus oralis</i> .
Complejo violeta	<i>Actinomyces odontolyticus</i> y <i>Veilonella parvula</i>
Complejo verde	Las 3 especies de <i>Capnocytophaga</i> , <i>Campylobacter concisus</i> . <i>Eikenella corrodens</i> , y <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotipo a.
Complejo Naranja	subespecies de <i>F. nucleatum</i> , <i>P. intermedia</i> y <i>P. nigrescens</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> y <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Campylobacter showae</i> , <i>Campylobacter gracilis</i> , <i>E. nodatum</i> , y <i>S. constellatus</i> .
Complejo rojo	<i>P. gingivalis</i> . <i>B. forsythus</i> , y <i>T. denticola</i> .

Dichos colores se correlacionan con el grado de severidad de periodontitis, siendo el complejo rojo el más asociado a un aumento en la profundidad de la bolsa periodontal y sangrado al sondaje.

En 2008, Haffajee y colaboradores, complementaron la información, demostrando las asociaciones de los microorganismos causales de la periodontitis en el margen supragingival, algunas bacterias encontradas en el margen subgingival aparecen nuevamente en los mismos complejos de este estudio, otras no (34):

Tabla 2. Complementación de complejos según Socransky de microorganismos causales de periodontitis en el margen supragingival

Complejo Amarillo	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguinis</i> y, algo separado, <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> , y <i>S. constellatus</i> . A estas especies se unieron <i>Leptotrichia buccalis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Eubacterium saburreum</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , y <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .
Complejo azul	Grupo compacto de especies de <i>Actinomyces</i> . Se compone de <i>A. israelii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. gerencseriae</i> , y <i>A. naeslundii</i> .
Complejo violeta	<i>Neisseria mucosa</i> y <i>Veillonella parvula</i> .
Complejo verde	<i>Capnocytophaga sputigena</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , y <i>Capnocytophaga gingivalis</i> .
Complejo Naranja	<i>Campylobacter showae</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i> , <i>F. n. subsp. vincentii</i> , <i>Fusobacterium periodonticum</i> , <i>F. n. subsp. polymorphum</i> , <i>Campylobacter gracilis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , y <i>Prevotella nigrescens</i> . A estos taxones se unieron <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Capnocytophaga ochracea</i> , <i>Selenomonas noxia</i> y <i>Prevotella melaninogenica</i> .
Complejo rojo	<i>T. forsythia</i> , <i>P. gingivalis</i> , y <i>T. denticola</i> . <i>Eubacterium nodatum</i> también era parte de este complejo y <i>Treponema socranskii</i> se asoció libremente con estas cuatro especies.

4.4.1.2. *Candida albicans* como formadora de biopelícula orales en periodontitis

La estructura interna de la biopelícula dental podría ser el resultado de interacciones de coagregación y coadhesión entre especies e intraespecies con la ayuda de moléculas específicas de adhesina-receptor (7).

Pese a tener las bacterias formadoras de biopelículas causantes periodontitis, no nombran en estos consorcios a los hongos. Sin embargo, hay estudios en los cuales se han encontrado especies del género *Candida* como agentes etiológicos de periodontitis. En sujetos con periodontitis, se demostró que *C. albicans* tiene la capacidad de unirse directamente a los receptores microbianos en los fibroblastos del ligamento periodontal del hospedero debido a las proteínas de la superficie manosiladas que recubren las células fúngicas, le confieren la hidrofobicidad, permiten la transición a hifas y la resistencia frente a los macrófagos, ambos esenciales para el establecimiento de lesiones crónicas

(35). Otro estudio encontró la presencia de *C. albicans* y *C. dubliniensis* en bolsas periodontales en sujetos con periodontitis crónica (21).

Candida albicans se encuentra típicamente colonizando las superficies de la mucosa oral como un microorganismo comensal (36). Sin embargo, bajo factores predisponentes, como el uso de antibióticos de amplio espectro, corticosteroides, hiposalivación, y en individuos inmunodeprimidos o sometidos a quimio o radioterapia, este organismo actúa como patobionte provocando infecciones en mucosas graves, a menudo en asociación con bacterias (37).

El dimorfismo es un factor de virulencia importante de *C. albicans*. Se define como la capacidad de *Candida sp.* Para cambiar la morfología entre las formas de levadura e hifas. *C. albicans* se encuentra predominantemente en forma de levadura durante la colonización temprana de la cavidad oral, sin embargo, la invasión posterior de las células epiteliales orales es predominantemente por la forma hifal (38). La colonización de *C. albicans* en la cavidad oral humana se puede lograr mediante su adherencia a una variedad de componentes de la película salival, incluidas las proteínas ricas en prolina y estaterina (39).

C. albicans, que reside en diferentes nichos del organismo hospedero, crea biopelículas que proporcionan un microambiente hipóxico dentro de la comunidad de biopelículas y apoyan el crecimiento de algunas bacterias anaeróbicas, incluso en condiciones aparentemente aeróbicas que normalmente son tóxicas para ellas (40).

4.4.2. Interacciones entre *Candida albicans* y bacterias periodontopatógenas

Las interacciones sinérgicas y antagónicas entre las contrapartes del microbioma / micobioma oral modulan la estabilidad ecológica en varios sitios de la cavidad oral, lo que ayuda a mantener un estado homeostático entre la microbiota y el hospedero (27). Entre estas interacciones se han encontrado:

- *Candida albicans* y *Streptococcus gordonii*: *S. gordonii* se une directamente a adhesinas específicas de hifas de *C. albicans* Als3p, Eap1p y Hwp1p a través del estreptococo SspB, que pertenece a la familia de polipéptidos del antígeno I / II. *S. gordonii* también expresa glucosiltransferasa G (gtfg) que contribuye a la coagregación con *C. albicans*, se considera un colonizador temprano de la cavidad oral. En cuanto a la percepción del quórum, el factor de detección de quórum de *S. gordonii* AI-2 induce la filamentación de *C. albicans*, y *S. gordonii* puede bloquear el efecto inhibitor del farnesol exógeno sobre la filamentación de *C. albicans* y la formación de biopelículas (41).
- *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*: Las exoenzimas glucosiltransferasas (Gtfs) de *S. mutans* se depositan en el α -manano de la superficie de *C. albicans*, generando la descomposición de la sacarosa y con esto la producción de glucanos en la pared celular fúngica facilitando

la adherencia entre los dos microorganismos tras la formación de una matriz extracelular extensa (16).

Moléculas de señalización producidas por bacterias afectan la formación de biopelículas de *C. albicans* o la morfogénesis como ácido láctico, H₂O₂, CO₂ y peptidoglicano bacteriano parecen promover la filamentación, mientras que las HSL inhiben la filamentación (42). Por otro lado, los ácidos grasos, ácidos carboxílicos y glucanos producidos por *C. albicans* son capaces de promover el crecimiento de bacterias, mientras que el farnesol inhibe la formación de biopelículas bacterianas (42).

- *Candida albicans* y *Actinomyces naeslundii*: La actividad metabólica de las cepas de *C. albicans* que se cultivadas en el medio ASM aumentó en presencia de *A. naeslundii* en biopelículas de cultivo dual. Se evidencia sinergismo ya que en presencia de *A. naeslundii*, *C. albicans* puede aumentar la actividad deshidrogenasa mitocondrial que, a su vez, aumenta la actividad de las succinato deshidrogenasas de *A. naeslundii*(38).
- *Candida albicans* y *Fusobacterium nucleatum*: Unión mediada por los componentes de carbohidratos en la superficie de *C. albicans* y los componentes de proteínas en la superficie celular de *Fusobacterium nucleatum*. La manoproteína FLO9 como el componente de superficie de *C. albicans* que media en la coadherencia con la proteína externa de unión a arginina, RadD, de *F. nucleatum* (39).
- *Candida albicans* y *Porphyromonas gingivalis*: *P. gingivalis* utiliza la proteína de la familia Inlj internalina para interactuar estrechamente con las hifas de *C. albicans* dentro de la estructura de la biopelícula (43). Se identificó sobreproducción de tres proteínas fúngicas en condiciones anóxicas, donde predomina la actividad de *P. gingivalis*, estas proteínas fueron Eno1 Mp65 y Eng1(40).

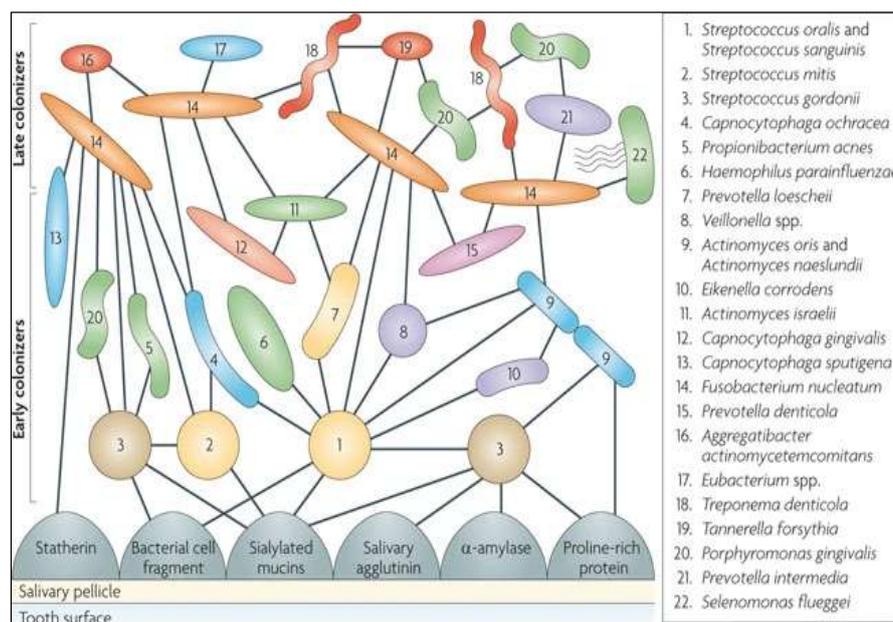


Figura 2. Modelo espaciotemporal de la colonización bacteriana oral.

Estas interacciones entre hongos y bacterias en una biopelícula mixta complican el tratamiento contra las infecciones polimicrobianas (44).

4.4.3. Etapas del desarrollo de una biopelícula causante de periodontitis.

La formación de las biopelículas orales es un proceso complejo ya que la colonización de las superficies de los dientes y del tejido bucal se produce de forma temporal, de modo que la unión de una especie se convierte en el andamiaje al que pueden adherirse otras especies, como se muestra en la Figura 2 (6). Este proceso de unión secuencial se denomina comúnmente coagregación (14). En los márgenes gingivales, donde los dientes se encuentran con las encías, las comunidades consisten en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, en los sitios subgingivales, las comunidades a menudo consisten principalmente en bacterias gramnegativas anaerobias obligadas (18). En cuanto a la adquisición de nutrientes, para los microorganismos orales son las proteínas del hospedador y las glicoproteínas, que se obtienen principalmente de la saliva para los organismos en la placa supragingival y del líquido crevicular gingival (GCF), cuya composición es similar al suero, para los que se encuentran en las biopelículas subgingivales (27).

- a. Biopelícula adquirida: Es la película salival que recubre el esmalte dental se denomina película salival adquirida, posee receptores celulares y salivales, como mucinas, proteínas ricas en prolina, estaterina, aglutinina salival (gp-340) y α -amilasa, a los que se adhieren los primeros colonizadores (17).
- b. Biopelícula temprana: las bacterias colonizadoras iniciales de la superficie dental limpia, en el margen supragingival de la boca humana y en condiciones de aerobiosis, son principalmente los estreptococos, es decir el complejo amarillo. Consecutivamente, especies como *Veillonella parvula* del complejo violeta estrechamente relacionadas con estreptococos y las especies de *Actinomyces*, del complejo azul, son considerados como los colonizadores tempranos (18). Hsa y Gspb son adhesinas estreptocócicas que interactúan con la película salival, las células epiteliales y las plaquetas sanguíneas (42)
- c. Biopelícula madura: Las biopelículas maduras son agregados de microorganismos que crecen dentro de una matriz extracelular a partir de una biopelícula primaria (17).

En este orden de ideas, a medida que la biopelícula madura, hacia un margen supragingival, se encuentran patógenos como *F. nucleatum*, del complejo naranja, que actúan como andamios para unir las bacterias colonizadoras tempranas con los patógenos anaerobios tardíos como las bacterias del complejo rojo (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*) y facilitar la colonización induciendo a una disbiosis, al interferir con el sistema inmunológico mediado por el complemento(32). *F. nucleatum* se une a *P. gingivalis* a través de una adhesina similar a lectina específica

de galactosa que reconoce el resto de azúcar en la cápsula y el lipopolisacárido de *P. gingivalis*. *F. nucleatum* También se une a los estreptococos por medio de la adhesina RadD (45).

Durante esta etapa, cuando las moléculas de señalización alcanzan una concentración suficiente, pueden comunicarse y coordinar la formación de biopelícula o la síntesis de factores de virulencia(17). El tener una biopelícula madura implica interacciones físicas, señales químicas y respuestas transcripcionales (18). Dentro de los ejemplos de interacciones bacterianas:

La unión de *Streptococcus gordonii* por medio de SspB a la proteína fimbrial menor Mfa1 de *P. gingivalis* (32).

La interacción entre la proteína fimbrial principal de *P. gingivalis*., Fim A, y *S. gordonii* GAPDH, que facilita la colonización de *P. gingivalis*. Y la pérdida de hueso alveolar inducida por *P. gingivalis* (32). Y la interacción de fimbrias menores, Mfa se acopla a las proteínas Ssp en la superficie de la célula estreptocócica y aumenta la avidéz de unión (45).

F. nucleatum puede crear un microambiente reducido que es óptimo para el crecimiento de *P. gingivalis*. *F. nucleatum* también puede generar amoníaco a partir de los ácidos glutámico y aspártico, aminoácidos que se encuentran en el líquido crevicular, elevando así el pH a los niveles preferidos por *P. gingivalis* (45).

También hay interacciones antagonistas como la producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, diferentes enzimas y liberación de fagos líticos. Estos compuestos pueden darle a un organismo una ventaja competitiva durante la colonización y cuando compite con otros microorganismos (27).

- d. Etapas tardías: La invasión y destrucción de tejidos blandos está mediada por enzimas difusibles microbianas, como lipasas, proteasas, nucleasas y ureasas (17). Tras la coagregación de los complejos, la persistencia de la biopelícula en la superficie del diente dará como resultado la estimulación continua del tejido gingival que rodea los dientes, lo que eventualmente causará inflamación y una ligera profundización de la hendidura gingival, llevando a una coagregación bacteriana de forma subgingival, volviendo las condiciones atmosféricas gradualmente anaerobias (29). La inflamación se da por la escasa disponibilidad de fuentes de energía obligando a las bacterias del complejo rojo a obtener energía de los factores del hospedador dañando los tejidos del hospedador. Además, las bacterias complejo rojo presentan gran virulencia debido a que poseen altos niveles de actividad de la proteína-degradantes que está en gran parte mediada por proteasas incluyendo gingipainas de *P. gingivalis*, PrtH de *T. forsythia*, y dentilisina de *T. denticola*(32).
- e. Dispersión: La última etapa del desarrollo de la biopelícula es el desprendimiento de células o agregados microbianos, que luego

colonizan la saliva y otros soportes. El desapego depende del apoyo, la comunidad microbiana, la disponibilidad de nutrientes, la hidrodinámica y las condiciones fisicoquímicas del medio. Este desprendimiento es facilitado por la lisis de polímeros extracelulares, como por la producción de dextranasas por *S. mutans*(17).

4.4.4. Matriz extracelular

La Matriz extracelular comprende aproximadamente el 30% del volumen total(25). En las matrices de biopelículas bacterianas exopolisacáridos (EPS), proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos lipoteicoicos e incluso lipopolisacáridos. Los componentes de la matriz, como el EPS, podrían afectar la difusión de sustancias dentro y fuera de la biopelícula, quizás ayudando a crear una amplia gama de microambientes dentro del biopelícula (46). Las propias células forman una barrera para el libre movimiento de moléculas y la matriz macromolecular extracelular, que a menudo está cargada negativamente, actúa como una resina de intercambio iónico para retardar el movimiento de compuestos cargados o reactivos a través de la biopelícula (47). Además, dentro de las funciones que tiene la matriz extracelular, se destaca la protección que brinda a las biopelículas de las terapias antimicrobianas (48). Finalmente, entre otras funciones incluyen la cohesión celular, la estructura de la comunidad, los recursos nutricionales, el sistema inmunológico del hospedero y la protección contra xenobióticos (49). Los xenobióticos son compuestos químicos que no forman parte de la composición de los organismos vivos (50).

Al momento de brindar nutrición a los microorganismos formadores de biopelículas, la matriz extracelular es una fuente potencial de carbono y energía. Los fructanos y glucanos solubles en la placa dental se pueden metabolizar mediante combinaciones de bacterias que producen enzimas exo y / o endohidrolíticas. Por tanto, las bacterias individuales dependen de la capacidad metabólica de otras especies para acceder a los nutrientes esenciales (27).

En cuanto a la producción de EPS por bacterias, los polisacáridos β -1,3-glucanos y β -1,6-glucanos secretados por *S. mutans* sintetizados por glucosiltransferasas (Gtfs), son los componentes principales de la matriz extracelular de la biopelícula de *S. mutans* (51). Por otro lado, los polisacáridos secretados por *C. albicans* son componentes importantes de la matriz de la biopelícula fúngica, siendo el α -manano el componente más abundante seguido del β -1,6-glucano y el β -1,3-glucano (49). La producción de exopolisacáridos por las glucosiltransferasas de *S. mutans* puede ser un mecanismo importante para generar heterogeneidad estructural y fisiológica dentro de las biopelículas (47). Esta heterogeneidad se da al formar una intrincada red de islotes bacterianos (microcolonias) entrelazados con exopolisacáridos a través de interacciones localizadas de célula a matriz (46).

4.5. Técnicas metodológicas en el análisis de biopelículas.

4.5.1. Conteo Unidades Formadoras de Colonias: método de placa

Una célula viable es aquella capaz de dividirse y dar lugar a una descendencia. Este método se basa en contar el número de células viables de la muestra capaz de formar colonias en un medio sólido adecuado, ya que cada célula viable es capaz de formar una colonia, como se esquematiza en la Figura 3 (52). Implica la dilución en serie de las muestras, seguida de la difusión de 50 a 100 ml de cada dilución en un medio de agar. Después de la incubación, se cuentan las colonias y se estiman las concentraciones bacterianas en la muestra original(53). Los recuentos totales de colonias obtenidos en UFC de las placas de agar incubadas y el factor de dilución respectivo utilizado se pueden combinar para calcular el número original de microorganismos en la muestra en UFC por ml(54):

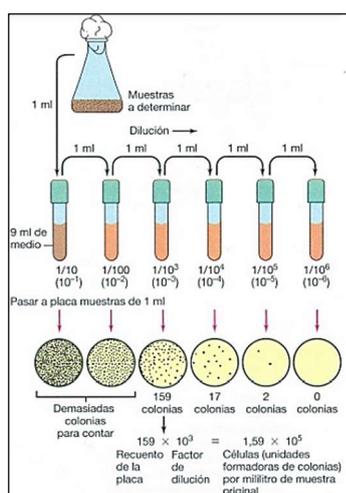


Figura 3. Esquematización del procedimiento del recuento de UFC/mL en placa.

El cálculo de UFC/mL se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonias por placa} * \text{factor de dilución}}{\text{mL de la muestra sembrada}}$$

Fórmula 1. Cálculo del número de UFC/mL por placa

4.5.2. Desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI- TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

Tecnología que permite el uso de la espectrometría de masas en la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (55). Una pequeña porción de una colonia bacteriana se deposita directamente sobre una placa metálica conductora. Después de la cristalización de la matriz y el

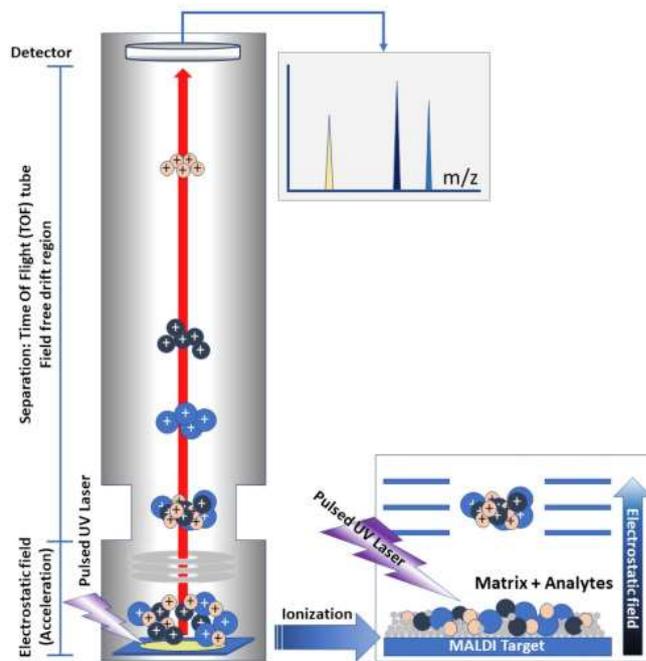


Figura 4. Representación esquemática de un espectrómetro de masas MALDI-TOF.

material microbiano, la placa de metal se introduce en el espectrómetro de masas y se bombardea con pulsos de láser breves. Las moléculas ionizadas se aceleran a través de un campo electrostático y son expulsadas a través de un tubo de vuelo de metal sometido a vacío hasta que alcanzan un detector, los iones más pequeños viajan más rápido que los iones más grandes, por lo tanto, los analitos son separados para crear un espectro de masas que está compuesto por picos masa a carga (m/z) con intensidades variables. Un espectro es una firma del microorganismo que se compara automáticamente con una base de datos para la identificación a nivel de género y especie. Los resultados son revisados con base en el valor de puntuación (Bruker) o nivel de confianza (Biomérieux) y, de ser aceptables, son posteriormente exportados o consignados en el sistema de información propio del laboratorio (56). Los espectros de masas MALDI-TOF consisten en picos de proteínas intracelulares muy abundantes, incluidas las proteínas de la subunidad ribosómica, que están presentes en un alto número de copias en las células bacterianas en replicación(57).

La figura 4 (58) muestra esquemáticamente el proceso de identificación en MALDI-TOF.

4.5.3. Análisis de viabilidad celular con MTT

El MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) es una sal de tetrazolio comúnmente utilizada en cultivos celulares, en su composición se encuentran grupos laterales lipofílicos y carga neta positiva, permitiéndole atravesar la membrana celular y reducirse en células viables por enzimas mitocondriales o plasmáticas como oxidoreductasas, deshidrogenasas, oxidasas y peroxidasas usando NADH, NADPH, succinato o piruvato como electrón donante; dando como resultado la formación de cristales insolubles en

agua color púrpura denominado formazán (59). Así como se demuestra en la Figura 5 (60). Posterior a la incubación de las células con MTT se añade dimetilsulfóxido (DMSO), el cual permite la solubilización de los cristales de formazán (61). El compuesto es reducido por enzimas de la cadena respiratoria que están localizadas en la membrana plasmática de las bacterias, mientras que, en las levaduras, esta sal se reduce por deshidrogenasas mitocondriales(62).

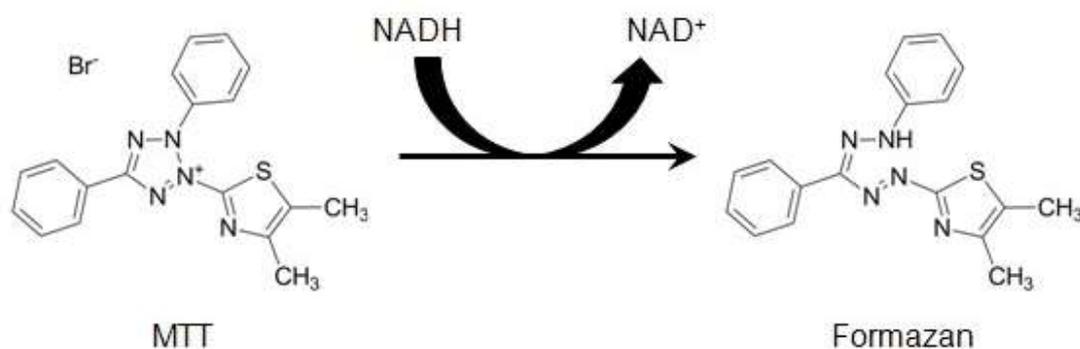


Figura 5. Reducción enzimática de MTT a formazán.

4.6. Antecedentes

Estudios previos han demostrado la interacción de biopelículas polimicrobianas entre bacterias y *C. albicans*. Pese a que hay variedad de agentes etiológicos en la periodontitis, en estos estudios se desarrollaron biopelículas de doble especie: *C. albicans* y *Streptococcus mutans*(16), *C. albicans* y *Streptococcus gordonii* (41), *C. albicans* y *Fusobacterium nucleatum* (39), *C. albicans* y *Porphyromonas gingivalis* (43); o de tres especies *C. albicans*, *Actinomyces naeslundii* y *Streptococcus mutans*(38). Los resultados demuestran que existe una interacción fúngico-bacteriana, por medio de microfotografías tomadas al ser observadas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) o Microscopía de Escaneo Confocal Láser (CLSM), relacionado a *C. albicans* con bacterias periodontopatógenas.

Por otra parte, se han desarrollado y validado modelos *in vitro* de biopelículas de múltiples especies bacterianas que hacen parte de la microbiota subgingival(19). No obstante, en este estudio no se tuvo en cuenta la presencia de *C. albicans*, a diferencia del modelo de un biopelícula *in vitro* complejo que imita las alteraciones ambientales y de especies durante la conversión de un modelo de biopelícula 'supragingival' a 'subgingival' (29) en el cual se contó con la participación de *C. albicans* como microorganismo colonizador. Sin embargo, no brindan información acerca de la viabilidad de *C. albicans* estudiada a través de CLSM o SEM.

Finalmente, al evaluar la importancia de *C. albicans* en la interacción de biopelículas polimicrobianas, se encontraron biopelículas más robustas y reproducibles al momento de estar *C. albicans* presente (63). A pesar de tener

en cuenta el rol de *C. albicans* en la biopelícula polimicrobiana, no se evaluó la estructuración de la biopelícula. Asimismo, se realizó el análisis metabólico de biopelículas orales utilizando el colorante de viabilidad celular AlamarBlue, por otra parte, se han evidenciado experimentos en los que utilizan sales de tetrazolio como colorantes para el mismo fin (62) ya al ser métodos fluorométricos que permiten cuantificar la actividad metabólica de las células dentro de una biopelícula, dentro de los cuales se encuentran también diacetato de fluoresceína (FDA) y varias sales de tetrazolio como 2,3-bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil) -2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), 2- (4,5- bromuro de dimetil-2-tiazolil) -3,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) y cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC) (64).

5. Objetivos

5.1. General

- Describir los microorganismos asociados a periodontitis en sujetos atendidos en la clínica de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana para la formación de un modelo de biopelícula polimicrobiana *in vitro*.

5.2. Específicos

- Identificar y determinar la frecuencia de los microorganismos presentes en muestras de cavidad oral de sujetos con periodontitis.
- Establecer una biopelícula polimicrobiana *in vitro* con los microorganismos presentes en las muestras de los sujetos con periodontitis.

6. Metodología

1. Elección muestras inoculadas en 1mL de caldo tioglicolato, pertenecientes al banco de trabajo del Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) tomadas en la Clínica de la Facultad de Odontológica de la Pontificia Universidad Javeriana. Se eligieron muestras de placa subgingival, surco/bolsa gingival y saliva de 20 sujetos:
 - 10 sujetos diagnosticados con periodontitis y 10 sujetos sanos/gingivitis. Estos sujetos fueron incluidos según los siguientes criterios de inclusión:
 - Adultos mayores de 30 años.
 - Tener mínimo 6 dientes en boca.
 - No ser fumadores.
 - No tener diabetes.
 - No haber tomado antibióticos en los últimos tres meses.
2. Cultivo de muestras sujetos con periodontitis y muestras de sujetos sanos/gingivitis.

- Para las muestras saliva y placa subgingival se cultivaron por siembra masiva 100 ul (DO₆₀₀ 1.0 por literatura) de cada una en agar sangre en diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁴
 - Para las muestras de bolsa periodontal se cultivaron 100 ul (a excepción de 3 muestras de sujetos con periodontitis y una de sujeto sano/gingivitis se cultivaron 50 ul) por siembra masiva sin diluir.
 - Las cajas de agar sangre fueron incubadas a 37°C en atmosfera de anaerobiosis con bolsas Thermo Scientific™ Oxoid AnaeroGen de 2,5 litros durante 8 días.
3. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias en muestras de sujetos con periodontitis y de sujetos sanos/gingivitis:
- Se contaron UFC/mL de 69 cajas que evidenciaron crecimiento para muestras de sujetos con periodontitis.
 - Se contaron UFC/mL de 38 cajas que evidenciaron crecimiento muestras de sujetos sanos/gingivitis
4. Identificación de colonias utilizando MALDI- TOF, en sujetos con periodontitis y sujetos con sanos/gingivitis:
- Se identificación de 24 colonias de las muestras de placa subgingival diluida 10⁻³ de sujetos con periodontitis.
 - Se identificación de 26 colonias de las muestras de placa subgingival diluida 10⁻³ de sujetos sanos/gingivitis.

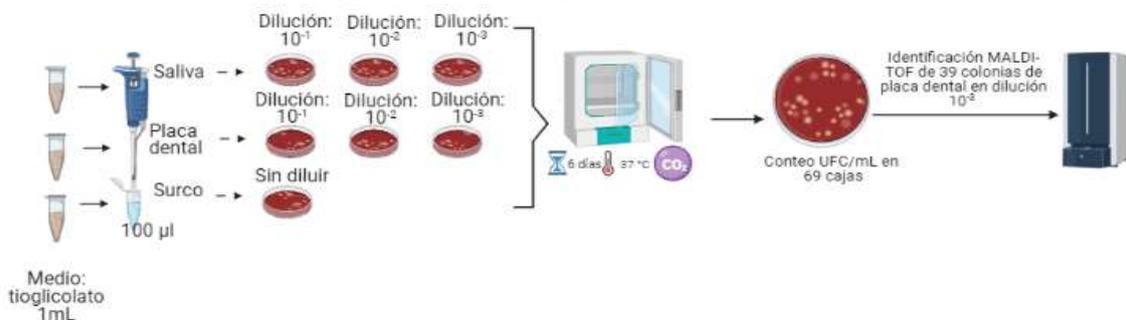


Figura 6. Procedimiento para el conteo de UFC/mL y la identificación en MALDI-TOF en muestras de sujetos con periodontitis.

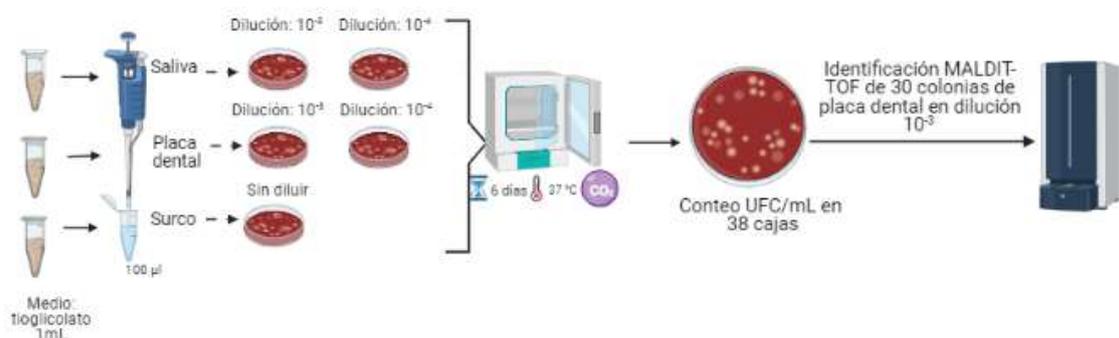


Figura 7. Procedimiento para el conteo de UFC/mL y la identificación en MALDI-TOF en muestras de sujetos sanos/gingivitis.

5. Formación de una biopelícula de 96 horas, tras realizar un inóculo por diluciones se realizó de la siguiente manera:
- Se prepararon 3 réplicas en 3 momentos diferentes, y posteriormente se realizó la formación de las biopelículas por triplicado en las placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano de 96 pozos.

NOTA:

Durante el experimento para la segunda y tercera réplica, se inoculó una segunda placa de 96 pozos para formar una biopelícula con el fin disgregarla y realizar el conteo de UFC/mL tras inocular 100uL de la suspensión. Posteriormente se realizó la identificación de las colonias recuperadas en MALDI-TOF.

- La suspensión microbiana stock fue preparada a partir de un asa llena de los microorganismos que crecieron en agar sangre a partir de un inóculo de 100 ul de la muestra pura de saliva, placa subgingival y surco/bolsa de un sujeto con periodontitis, en 4 mL en un medio BHI suplementado con mucina, bicarbonato de sodio, menadiona, extracto de levadura, cisteína, hemina y L-glutámico.

NOTA:

En experimentos no publicados y realizados en el grupo de investigación de Miosis Humanas y Proteómica de la Pontificia Universidad Javeriana, se realizó la identificación de la microbiota del sujeto con periodontitis, encontrando los siguientes resultados:

Tabla 3 Microorganismos identificados en las muestras de sujetos con periodontitis en estudios previos al presente proyecto

Muestra	Saliva	Placa	Surco/ Bolsa gingival
Microorganismos identificados	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
		<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
		<i>Parvimonas micra</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
		<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
		<i>Veillonella parvula</i>	

Al tener una diversidad de microorganismos asociados a los distintos complejos propuestos por Socransky, además de la presencia de la levadura *Candida albicans*, las muestras de este sujeto fueron utilizadas para preparar la suspensión microbiana y lograr la formación de una biopelícula como parte de un estudio piloto.

- Las placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fueron inoculadas con 200 μL de la suspensión microbiana stock sin diluir y en distintas diluciones (Desde 10^{-1} a 10^{-6}). El inoculo se realizó cada 24 h durante 4 días. Como blanco se utilizó un inoculo de 200 μL de caldo BHI suplementado.
6. Ensayo de viabilidad celular con sal de tetrazolio MTT (Merck Millipore, USA)
- Tras la incubación final, se realizó aspiración del caldo BHI con una pipeta multicanal.
 - Se agregaron 100 μL de MTT (0,3 mg/mL de MTT en PBS) a los pozos, posteriormente se incubaron a 37°C durante 1,5 horas en atmosfera de anaerobiosis.
 - La solubilización de cristales de formazán se logró con 100 μL de DMSO en cada pozo, posteriormente si incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación leve.
 - Se realizó lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm, en un lector de Microplacas para Absorbancia ELx800.

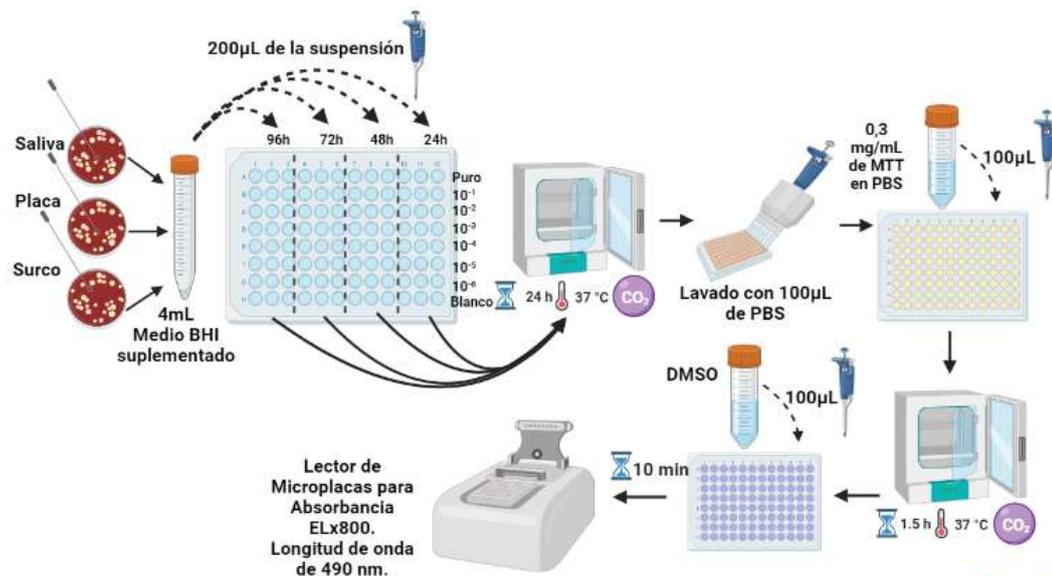


Figura 8. Procedimiento para la formación de una biopelícula de 96 horas y el ensayo de viabilidad microbiana con MTT.

7. Evaluación de la viabilidad y adherencia microbiana.
- Se realizó el conteo UFC de las biopelículas montadas en las Placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano de 96 pozos tras disgregarlas.
 - Se identificaron en MALDI-TOF las colonias recuperadas que crecieron en el agar sangre.

8. Análisis estadístico:

Para el análisis del número y especie de microorganismos identificados fueron utilizadas las tablas de frecuencia relativa. utilizando el Software GraphPad Prism versión 8.0.1 se determinó la media, mediana, desviación

estándar y varianza de las UFC/mL totales cuantificadas en muestras de saliva, placa subgingival y surco/bolsa.

Se analizó mediante ANOVA bidireccional el ensayo de viabilidad celular con MTT para encontrar efectos significativos de las variables. Para este experimento las variables independientes fueron las horas y la cantidad de inóculo y la dependiente fue la absorbancia a 490nm de las muestras. El análisis estadístico se realizó utilizando el Software GraphPad Prism versión 8.0.1. Las diferencias en las medias de los datos se consideraron significativas si $p < 0,05$.

7. Resultados

7.1. Conteo UFC/mL y frecuencia de microorganismos en muestras de sujetos con periodontitis y sujetos sanos/ gingivitis.

7.1.1. Conteo de unidades formadoras de colonias

Tabla 4 Resultados de estadística descriptiva UFC/mL de sujetos con periodontitis y sanos/gingivitis en muestras de saliva, placa subgingival y surco/bolsa

	MUESTRA SALIVA		MUESTRA PLACA		MUESTRA SURCO/BOLSA	
	SUJETOS CON PERIODONTITIS	SUJETOS SANOS/GINGIVITIS	SUJETOS CON PERIODONTITIS	SUJETOS SANOS/GINGIVITIS	SUJETOS CON PERIODONTITIS	SUJETOS SANOS/GINGIVITIS
N° SUJETOS	10	10	10	10	10	10
Mínimo	8.80E+05 UFC/mL	0.0	2.00E+04 UFC/mL	0.0	1.00E+01 UFC/mL	0.0
máximo	7.40E+06 UFC/mL	1.10E+08 UFC/mL	5.70E+06 UFC/mL	3.70E+06 UFC/mL	1.10E+04 UFC/mL	3.40E+03 UFC/mL
Rango	6.52E+06 UFC/mL	1.10E+08 UFC/mL	5.68E+06 UFC/mL	3.70E+06 UFC/mL	1.10E+04 UFC/mL	3.40E+03 UFC/mL
Media	3.91E+06 UFC/mL	6.05E+07 UFC/mL	1.70E+06 UFC/mL	6.75E+05 UFC/mL	2.39E+03 UFC/mL	5.39E+02 UFC/mL
Desviación estándar	2.25E+06 UFC/mL	4.74E+07 UFC/mL	2.01E+06 UFC/mL	1.24E+06 UFC/mL	3.73E+03 UFC/mL	1.07E+03 UFC/mL
Error estándar de la media	7.13E+05 UFC/mL	1.50E+07 UFC/mL	6.35E+05 UFC/mL	3.92E+05 UFC/mL	1.18E+03 UFC/mL	3.39E+02 UFC/mL
Límite inferior del Intervalo de Confianza de la media 95%	2.30E+06	2.66E+07	2.63E+05	-2.12E+05	-2.85E+02	-2.28E+02
Límite superior del Intervalo de Confianza de la media 95%	5.52E+06	9.43E+07	3.14E+06	1.56E+06	5.06E+03	1.31E+03
Coefficiente de variación	58%	78%	118.10%	183.60%	156.50%	199.00%

La media en muestra de saliva entre los 10 sujetos con periodontitis es de 3.91×10^6 UFC/mL con una desviación estándar de 2.25×10^6 UFC/mL, para sujetos sanos/gingivitis 6.05×10^7 UFC/mL con una desviación estándar de 4.74×10^7 UFC/mL. También con un coeficiente de variación amplio entre los

sujetos, de 58% para sujetos con periodontitis y 78% para los sujetos sanos/gingivitis.

La media en muestra de placa subgingival entre los 10 sujetos con periodontitis es de $1.70 \cdot 10^6$ UFC/mL con una desviación estándar de $2.01 \cdot 10^6$ UFC/mL, para sujetos sanos/gingivitis $6.75 \cdot 10^5$ UFC/mL con una desviación estándar de $1.07 \cdot 10^6$ UFC/mL. También con un coeficiente de variación amplio entre los sujetos, de 118% para sujetos con periodontitis y 183.6% para los sujetos sanos/gingivitis.

Finalmente, en muestra de surco/bolsa entre los 10 sujetos con periodontitis es la media es de $5.39 \cdot 10^2$ UFC/mL con una desviación estándar de $2.01 \cdot 10^3$ UFC/mL y un coeficiente de variación entre los sujetos del 156.50% para sujetos con periodontitis y 199% para los sujetos sanos/gingivitis.

7.1.2. Frecuencia de microorganismos identificados en las muestras

Las identificación de colonias mediante MALDI-TOF se clasificaron como:

- Rango de 2.300 ... 3.000: Identificación de especies altamente probable.
- Rango de 2.000 ... 2.299: Identificación segura del género, identificación probable de especies.
- Rango de 1.700 ... 1.999: Identificación de género probable.
- Rango de 0.000 ... 1.699: Identificación no confiable.

En las muestras de sujetos con periodontitis e identificaron las siguientes especies: *S. oralis* (17.9%), *P. micra* (7.1%), *S. salivarius* (3.6%), *A. oris* (7.1%), *S. sanguinis* (7.1%), *A. naeslundii* (7.1%), *S. mitis* (7.1%), *S. exigua* (3.6%), *F. nucleatum* (7.1%), *S. gordonii* (7.1%), *S. cristatus* (7.1%), *S. parasanguinis* (7.1%), *C. acnes* (3.6%), *S. pneumoniae* (3.6%) y *S. anginosus* (3.6%). Representadas en la Figura 9.

A. Frecuencia Microorganismos en Sujetos con Periodontitis

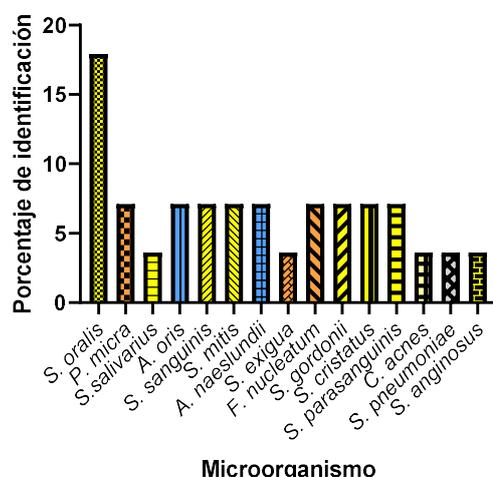


Figura 9. Frecuencia de Microorganismos en muestra de placa subgingival con dilución 10^{-3} en sujetos con periodontitis identificados por MALDI-TOF.

En cuanto a las muestras de sujetos sanos/gingivitis fueron identificadas las siguientes especies: *S. oralis* (18.5%), *A. oris* (11.1%), *S. sinensis* (3.7%), *E. faecalis* (3.7%), *S. sanguinis* (3.7%), *S. constellatus* (7.4%), *A. naeslundii* (11.1%), *S. anginosus*, (3.7%), *S. gordonii*, (11.1%), *L. umeaense* (3.7%), *S. pneumoniae* (3.7%), *S. mitis* (7.4%), *S. intermedius* (3.7%), *S. epidermidis* (3.7%) y *S. vestibularis* (3.7%). Representadas en la Figura 10.

B. Frecuencia Microorganismos en Sujetos Sanos/ Gingivitis

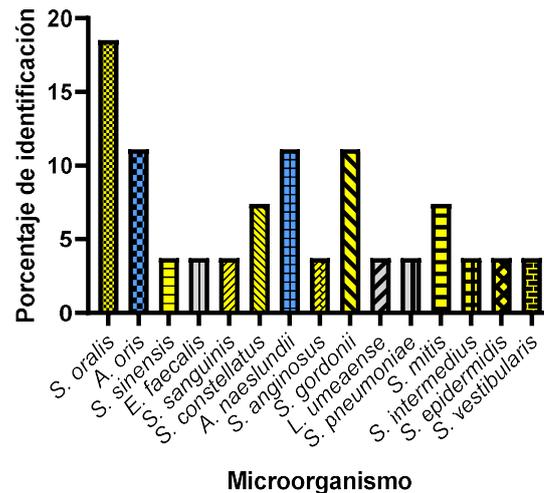


Figura 10. Frecuencia de Microorganismos en muestra de placa subgingival con dilución 10^{-3} en sujetos sanos/ gingivitis identificados por MALDI-TOF.

7.2. Ensayo de viabilidad celular con MTT, conteo UFC/ml y frecuencia de microorganismos de las réplicas

7.2.1. Ensayo de viabilidad celular con MTT

La viabilidad fue determinada por el ensayo con MTT, como se muestra en la Figura 11, debido a que la cantidad de formazán formado tras la reducción de MTT es directamente proporcional al número de células viables, se midieron los cambios metabólicos por colorimetría se en cada una de las 3 réplicas. Los resultados demuestran que no hay diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las biopelículas al evaluarlas en distintas cantidades de inóculos o al ser incubadas en diferentes tiempos. Además, se observa en la gráfica la variación entre los valores de las 3 réplicas al ser analizada la interacción entre los dos factores (cantidad de inóculo y tiempo en horas) con un porcentaje variación de 1.9%. Entre las cantidades de inóculo este porcentaje fue de 11.4% y entre las horas un valor de 6.7%.

Ensayo Viabilidad Biopelículas

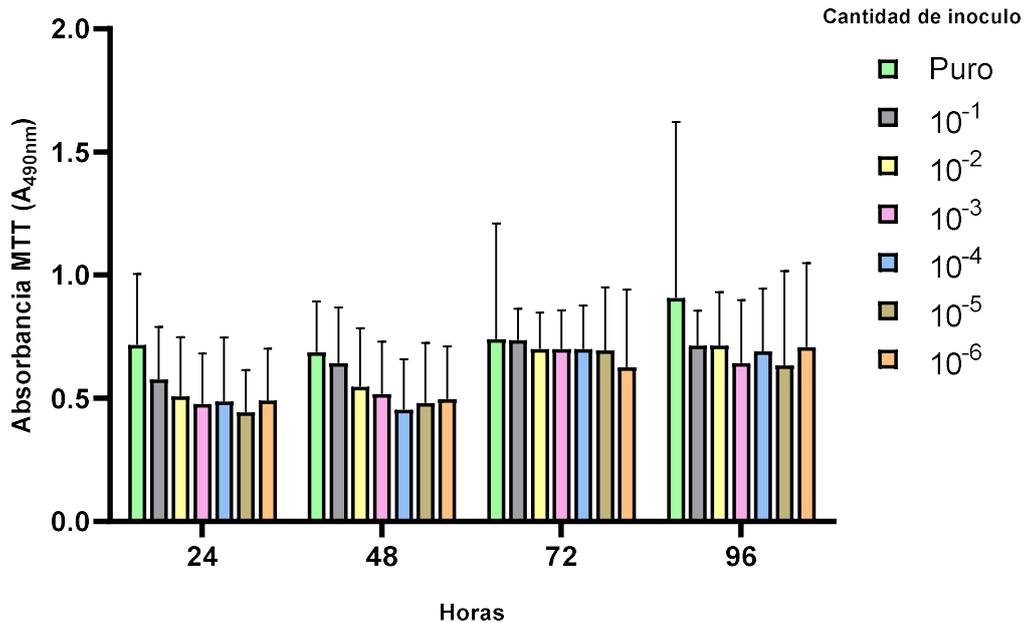


Figura 11. Ensayo de viabilidad celular de la biopelícula de 96 horas con MTT. La gráfica muestra los valores de la absorbancia a una onda de 490nm de las biopelículas con distintas cantidades de inóculo durante 4 momentos, a las 24, 48, 72 y 96 horas.

7.2.2. Recuento UFC/mL de las replicas

Tabla 5. Resultados de estadística descriptiva UFC/mL de las réplicas 2 y 3

	RÉPLICAS	
	2	3
N° de valores	4	4
Mínimo	2.44E+07 UFC/mL	5.55E+09 UFC/mL
Máximo	2.44E+07 UFC/mL	5.55E+09 UFC/mL
Rango	0.000	0.000
Media	2.44E+07 UFC/mL	5.55E+09 UFC/mL
Desviación estándar	0.0	0.0
Error estándar de la media	0.0	0.0
Límite inferior del Intervalo de Confianza de la media 95%	2.44E+07 UFC/mL	5.55E+09 UFC/mL
Límite superior del Intervalo de Confianza de la media 95%	2.44E+07 UFC/mL	5.55E+09 UFC/mL
Coefficiente de variación	0.0%	0.0%

Tras disgregar mecánicamente por pipeteo las biopelículas formadas en los pozos de la placa de microtitulación, fueron sembrado 100 uL en agar sangre de estas biopelículas ya diluidas en el medio donde se había formado, para realizar el conteo de UFC/mL y la identificación de los microorganismos recuperados.

El promedio de las UFC/mL en la Réplica 2 fue de $2.44 \cdot 10^{07}$, mientras que en la réplica 3 $5.55 \cdot 10^{09}$.

7.2.3. Frecuencia de microorganismos identificados en las replicas

Complementando los resultados de la Tabla, se realizó la identificación de los microorganismos recuperados en las Réplicas 2 y 3 por medio de MALDI-TOF.

Microorganismos reidentificados recuperados en la réplica 2. En total se identificaron 22 colonias, entre ellas las especies: *S. oralis* (36.4%), *S. epidermidis* (9.1%), *S. aureus* (27.3%), *C. granulosum* (4.5%), *F. nucleatum* (18.2%) y *L. paracasei* (4.5%). Como se muestra en la Figura 12.

Microorganismos Reidentificados replica 2

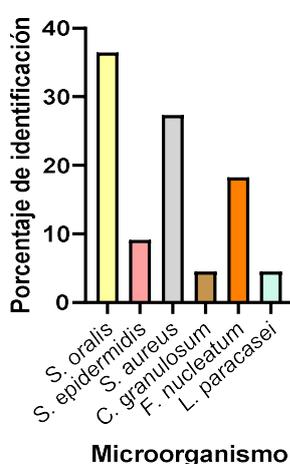


Figura 12. Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 2 de la biopelícula.

Por otra parte, las colonias mostradas en la Figura 12, se encontraron en las biopelículas de la réplica 2 distribuidas por horas en la Figura 13 de la siguiente forma:

- 24 horas: *S. aureus* (4.5%)
- 48 horas: *S. oralis* (9.1%) y *S. aureus* (4.5%)
- 72 horas: *S. oralis* (18.2%), *S. aureus* (4.5%), *C. granulosum* (4.5%), *F. nucleatum* (18.2%) y *L. paracasei* (4.5%)
- 96 horas: *S. oralis* (9.1%), *S. aureus* (9.1%), *C. granulosum* (4.5%) y *S. epidermidis* (9.1%).

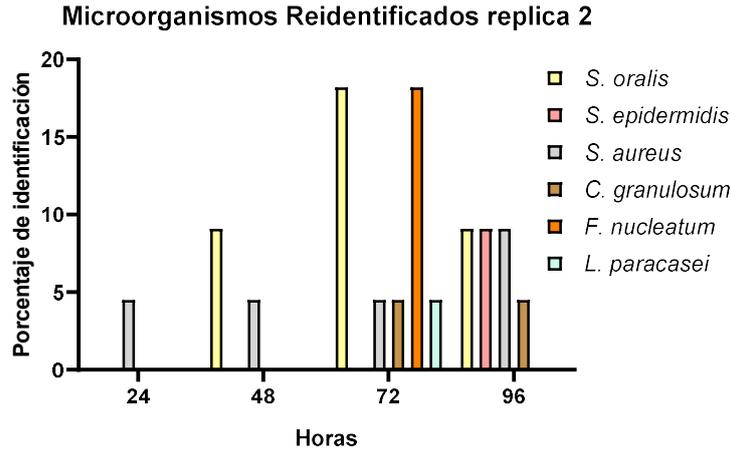


Figura 13. Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 2 de la biopelícula por horas.

Microorganismos reidentificados recuperados en la réplica 3. En total se identificaron 3 especies de microorganismos: *A. oris*(94.3%), *S. oralis* (2.9%) y *S. mutans* (2.9%). Representados en la Figura 14.

Microorganismos Reidentificados replica 3

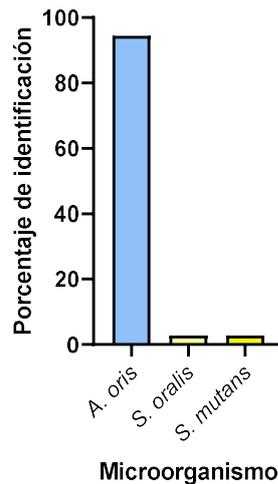


Figura 14. Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 3 de la biopelícula.

Complementando Las colonias mostradas en la Figura 14, se encontraron en las biopelículas de la réplica 2 distribuidas por horas en la Figura 15 de la siguiente forma:

- 24 horas: *A. oris* (31.4%) y *S. oralis* (2.9%).
- 48 horas: *A. oris* (20 %).
- 72 horas: *A. oris* (25.7 %).
- 96 horas: *A. oris* (17.1 %) y *S. mutans* (2.9%).

Microorganismos Reidentificados Replica 3

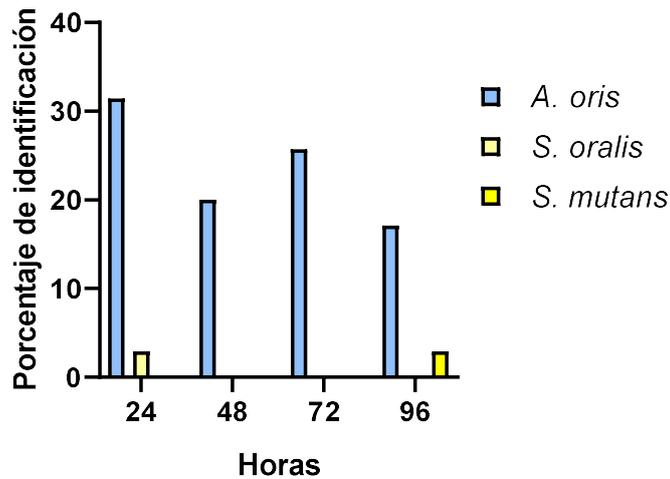


Figura 15. Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 3 de la biopelícula por horas.

7.2.4. Reidentificación de microorganismos recuperados antes y después de la formación de la biopelícula por réplicas representados en gráficas de tortas

En la identificación de microorganismos previa a la formación de biopelículas en el presente proyecto, utilizando la muestra de placa en dilución 10^{-3} fueron identificadas dos colonias de *S. mutans* como se muestra en la Figura 16

Porcentaje de microorganismos identificados previos a la formación de la biopelícula

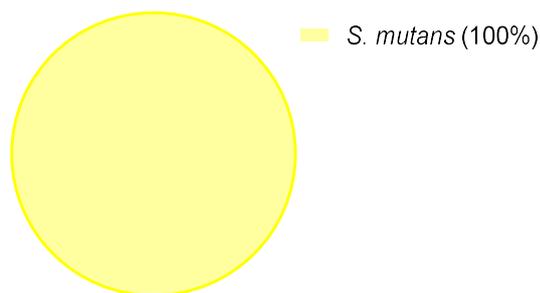


Figura 16 Porcentaje de microorganismos identificados previos a la formación de la biopelícula: únicamente fue identificado en MALDI- TOF *Streptococcus mutans*

Comparando este resultado con los de las Figuras 17 y 18, las cuales reflejan la diversidad de microorganismos recuperados e identificados en las réplicas 2 y 3 respectivamente

Porcentaje de microorganismos identificados en la Réplica 2

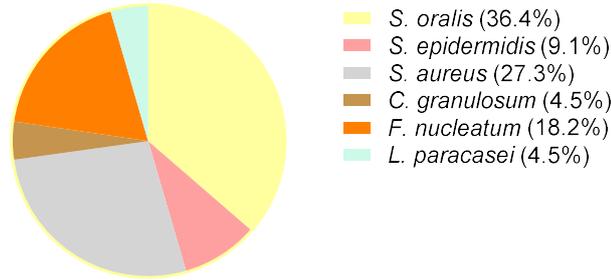


Figura 17 Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 2 de la biopelícula.

Porcentaje de microorganismos identificados en la Réplica 3

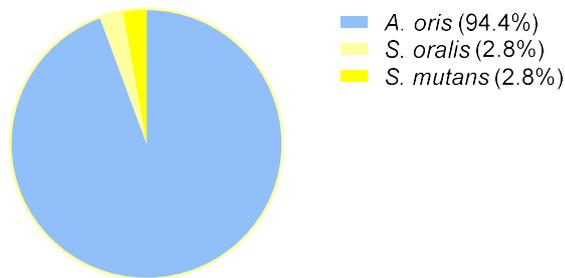


Figura 8 Porcentaje de microorganismos reidentificados en la réplica 3 de la biopelícula

8. Discusión

En este estudio se analizó el recuento de UFC/mL en tres muestras: saliva, placa subgingival y surco/bolsa tanto en sujetos con periodontitis como en sujetos sanos/gingivitis. Los elevados coeficientes de variación entre los resultados de UFC/mL en las tres muestras de ambos grupos de sujetos, plasmados en la Tabla 4, se deben a que los datos registrados del recuento por cada muestra presentan una variabilidad, por ende, se refleja gran dispersión respecto a la media. También estos resultados demuestran la variabilidad del recuento entre la muestras, indicando así la que composición de la biopelícula varía no sólo entre los diferentes sitios de la cavidad oral, sino también entre los individuos (31).

Posteriormente, tras la identificación de microorganismos en las tres muestras en sujetos con periodontitis (Figura 9), se observa como resultado una alta frecuencia de especies del complejo amarillo *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. gordonii* y *S. anginosus*. También se observan especies del complejo azul con la presencia de *A. oris* y *A. naeslundii* y del complejo naranja *F. nucleatum*, *P. micra*, *S. exigua* y *C. acnes*. Además, se resalta la presencia de microorganismos atípicos no asociados a los complejos de Socransky como *S. pneumoniae*. Así mismo, en sujetos sanos/gingivitis (Figura 10) se registra alta frecuencia de especies del complejo amarillo *S. oralis*, *S. sinensis*, *S. sanguinis*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. intermedius* y *S.*

vestibularis También se observan especies del complejo azul con la presencia de *A. oris*. Sin embargo, no se identificaron microorganismos del complejo naranja, correlacionando que al ser sujetos sanos/gingivitis no tienen microorganismos puente que favorezcan la unión de microorganismos periodontopatógenos clave como aquellos asociados al complejo rojo. De igual manera, se resalta la presencia de microorganismos atípicos no asociados a los complejos de Socransky como *E. faecalis*, *L. umeaense* y *S. epidermidis*. Las bacterias son los principales microorganismos colonizadores de la cavidad oral, haciendo referencia a las bacterias encontradas en los sujetos sanos/gingivitis se correlacionan con el estado simbiótico, definido como una composición, actividad y ecología microbiana que mantiene una relación equilibrada con el huésped, lo que resulta en un estado saludable(65). En contraparte, las bacterias encontradas en sujetos con periodontitis reflejan un estado de disbiosis. Además, la variación interindividual en la composición de la microbiota oral es el resultado de diferencias en el medio ambiente, la genética, la edad y el estilo de vida del hospedero(66) Hay que mencionar, además, la no recuperación de *C. albicans*, sin embargo, no se descarta su presencia en las muestras de los sujetos, debido a que hay estudios que demuestran la presencia de esta levadura en muestras de sujetos con periodontitis(23),(22). De igual modo, en experimentos no publicados y realizados en el grupo de investigación de Micosis Humanas y Proteómica de la Pontificia Universidad Javeriana, se ha identificado dentro de la microbiota oral del sujeto con periodontitis a *C. albicans* en muestras de saliva y placa subgingival como se establece en la Tabla 3. Posiblemente la no identificación de colonias de *C. albicans*, así como de otras colonias de microorganismos a identificar durante el desarrollo del proyecto en diferentes momentos, se deba a una muestra deficiente a analizar en MALDI-TOF, por ende, hubo falta de obtención de señales mediante el uso de espectrometría de masas reportando un resultado "sin picos encontrados", y en otros casos la falta de correspondencia entre un espectro y un espectro en la base de datos se reportó el resultado como "una identificación no fiable"(67), puesto que actualmente bien establecido que la calidad espectral de masas MALDI-TOF está influenciada por la cantidad de material de colonias bacterianas agregadas a la placa objetivo, la edad de la colonia bacteriana, así como el protocolo de preparación de muestras utilizado(57). También se presume que la metodología de recuperación de esta levadura no fue la más favorable para su crecimiento, ya que posiblemente las bacterias sean metabólicamente más activas que *Candida albicans* durante su crecimiento en agar sangre, situación que también pudo haberse dado durante la resiembra de las muestras.

Por otra parte, tras el análisis del ensayo de viabilidad celular con MTT, graficado en la Figura 11. Al no encontrar diferencias estadísticas significativas entre la interacción de horas y cantidad de inóculo, se considera como un factor de alteración en los resultados de la viabilidad de la biopelícula, el aspirado excesivo al momento previo de agregar MTT, con el cual se eliminan el medio de cultivo

sobrenadante, este aspirado pudo dar lugar a resultados falsos negativos y el hecho de no tener precaución durante el uso de pipetas ya que puede provocar la rotura de la biopelícula ocasionando el arrastre de esta al momento de pipetear durante el lavado(68). Es posible que los microorganismos metabólicamente activos se encontraran principalmente en las biopelículas de 24 y 48 horas, llegando a la fase estacionaria a las 72 horas, donde se observa mayor viabilidad celular y un comportamiento mayoritariamente similar entre cantidad de inóculo, este resultado se asemeja a la literatura en el cual a este tiempo la evaluación de la biomasa y la vitalidad celular dentro de la biopelícula permitió demostrar la reproducibilidad de la biopelícula(19). En este momento, se prevé que la biopelícula presente gran biomasa, puesto que es una biopelícula madura, cuya coagregación de bacterias permite un ambiente anaerobio por la disminución de la tensión de oxígeno al interior de la biopelícula favoreciendo el crecimiento de especies colonizadoras secundarias del complejo naranja como *F. nucleatum*, la cual actúa como andamio para unir las bacterias colonizadoras tempranas con los patógenos anaerobios tardíos como las bacterias del complejo rojo (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*).

Para el recuento de UFC/mL en las dos réplicas de biopelícula definidos en la Tabla 5, los números de valores analizados fueron 4, correspondientes a los 4 momentos por horas en los que se realizó la formación de la biopelícula. Teniendo en cuenta los resultados de valores como la desviación estándar y el coeficiente de variación dieron como resultado un valor de 0, indican que no existe una variabilidad en los datos respecto a la media al realizar el recuento, ya que los valores fueron iguales en todos los casos. Este resultado indica que el tiempo de incubación no influyó en el recuento de UFC/mL ya que el conteo fue el mismo en estos tiempos. Además, se debe resaltar la presencia de microorganismos viables, con rápida división celular que estén creciendo en la biopelícula en menor tiempo y con esto compensen el número de microorganismos que se encuentran en una fase de muerte.

En cuanto a la identificación de microorganismos recuperados por réplica, la mayoría de los microorganismos identificados en la réplica 2 son aquellos pertenecientes al complejo amarillo, clasificados como colonizadores iniciales como lo es *S. oralis*, el microorganismo puente del complejo naranja *F. nucleatum* y finalmente microorganismos atípicos, no clasificados dentro de los complejos propuestos por Socransky como *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. granulosum*, *C. acnes* y *L. paracasei*. Teniendo en cuenta los resultados de las Figuras 12 y 13, no se debe presumir que cada uno de estos microorganismos identificados sean aquellos microorganismos representativamente metabólicamente activos en la biopelícula, debido a que había más colonias que no fueron identificadas en MALDI-TOF posiblemente por muestra insuficiente como se explicó anteriormente. Mientras que en la réplica 3, *A. oris* de género perteneciente al complejo azul de Socransky fue el más frecuente, le siguen los

géneros estreptococos del complejo amarillo como *S. mutans* y *S. oralis*. En este caso, debido a la morfología que se observó en las placas de agar sangre y correlacionándolo con los resultados de las Figuras 14 y 15 junto al ensayo de viabilidad, es presumible que el microorganismo metabólicamente activo al que se le asume dicho resultado a *A. oris*, probablemente junto a distintas especies de estreptococos, las cuales no fueron identificadas por MALDI-TOF posiblemente por muestra insuficiente como se explicó anteriormente. Sin embargo, por morfología y por la observación de hemólisis en el agar se presume dicha presencia. Es presumible que las diferencias en los resultados de la identificación de microorganismos entre réplicas se deban a alteraciones en el momento de realizar la resiembra de la muestra lo que podría llevar al favorecer el crecimiento de algunos microorganismos, o errores en la manipulación al no homogenizar correctamente la muestra en el medio al momento de inocular la muestra, además, es probable que en la réplica 3 existiera mayor presencia de oxígeno respecto a la réplica 2 y por este motivo no se observan especies anaerobias como las del complejo naranja.

En la cavidad oral, específicamente en la placa subgingival se encuentran en menor proporción especies como estreptococos y *Neisseria* spp. Por su parte, la placa supragingival, contiene una mayor proporción de especies anaeróbicas como *Actinomyces* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* (69). Además, un microorganismo clave en la formación de estos consorcios es *F. nucleatum*, especie gramnegativa que coagrega con todos los colonizadores tempranos y los colonizadores tardíos (70). Debido a esto es presumible la presencia de especies asociadas al complejo rojo, sin embargo, no se evidenció crecimiento debido a la presencia de oxígeno al momento de incubar, al ser microorganismos anaerobios estrictos, las condiciones de su crecimiento deben ser meticulosamente desarrolladas. Aunque no se hayan identificado bacterias de este complejo, si se identificaron microorganismos capaces de inducir periodontitis como los microorganismos asociados al complejo naranja, puesto que estos también expresan factores de virulencia destructivos del tejido, como diferentes enzimas proteolíticas, sustancias citotóxicas y toxinas(31).

En último lugar, seguido del análisis de los microorganismos al momento previo de la formación de la biopelícula, como se observa en la Figura 16, únicamente *S. mutans* fue identificado en muestra de placa diluida a 10^{-3} , mientras que en los gráficos de las Figuras 17 y 18 se observa mayor variabilidad de microorganismos al ser recuperados tras la formación de biopelícula. Es así como el microambiente generado en la biopelícula formada en un medio líquido suplementado favorece el crecimiento de los microorganismos de los complejos amarillo, azul y naranja, caso que no sucede al inocular la muestra en agar sangre, demostrando favorablemente el efecto de las interacciones que existen entre los microorganismos de los diferentes nichos orales para el crecimiento.

9. Conclusiones

1. A partir de la identificación de microorganismos en muestras de saliva, placa y surco, se logró la recuperación de bacterias asociadas a los complejos amarillo, azul y naranja. No se logró la recuperación de *C. albicans*, aunque esta se identificó en un primocultivo. Por otra parte, los microorganismos asociados al complejo rojo no fueron recuperados, teniendo en cuenta este escenario es posible que la sensibilidad del método no permita la recuperación de estos microorganismos asociados al complejo rojo. Además, la patogénesis de la periodontitis no recae únicamente en estos microorganismos asociados al complejo rojo si no que es problemática polimicrobiana que requiere estudios más profundos para establecer el rol de este consorcio microbiano.
2. El modelo de biopelícula polimicrobiano establecido en este estudio para la formación de una biopelícula a partir de microorganismos salvajes, nos evidencia que aquellos microorganismos que mayor adaptabilidad presentaron en el desarrollo de la biopelícula son aquellos asociados al complejo amarillo.
3. Con base en que el establecimiento de la biopelícula es un proceso jerárquico y dinámico donde hay microorganismos colonizadores primarios, secundarios- puente y tardíos; se requieren 72 h del cultivo polimicrobiano para la recuperación y adaptabilidad al microambiente de diversos microorganismos asociados a los complejos amarillos, naranja y azul.

10. Recomendaciones

Se recomienda realizar nuevamente el experimento con un mayor número de replicas con el fin de tener resultados estadísticamente significativos para su análisis. Así mismo, realizar la recuperación de los microorganismos en agares selectivos, en el caso de *Candida albicans* utilizar un agar Sabouraud cloranfenicol. Además, realizar un análisis de la estructura y distribución espacial de los microorganismos formadores de la biopelícula por medio de técnicas de microscopía como SEM o CLSM, ensayos de viabilidad celular más allá de los colorimétricos tales como tinciones utilizando el kit de viabilidad bacteriana BacLight LIVE/DEAD el cual permite la identificación de bacterias vivas y muertas utilizando un microscopio de fluorescencia y el Kit de viabilidad de levaduras LIVE/DEAD para citometría de flujo. Complementado lo anterior con la determinación cuantitativa de los microorganismos en las biopelículas mediante qPCR en tiempo real y finalmente al realizar el conteo de UFC/mL se sugiere que sea realizado por dos personas.

11. Bibliografía

1. Vos T, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abate KH, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211–59.
2. Darveau RP. Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):481–90.
3. WHO. Oral health [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
4. Minsalud. IV ESTUDIO NACIONAL DE SALUD BUCAL ENSAB IV Situación en Salud Bucal. ENSAB IV. 2014;381.
5. Brown JL, Johnston W, Delaney C, Short B, Butcher MC, Young T, et al. Polymicrobial oral biofilm models: simplifying the complex. *J Med Microbiol*. 2019;68(11):1573–84.
6. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471–80.
7. Park JH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *J Periodontal Implant Sci*. 2014;44(2):79–84.
8. Baumgardner DJ. Oral Fungal Microbiota: To Thrush and Beyond. *J Patient-Centered Res Rev*. 2019;6(4):252–61.
9. Latorre C, Arregoces F, Porras J, Ferro B, Morales A. Ultra-Sensitive C-Reactive Protein (US-CRP) in Patients With Periodontal Disease and Risk of Acute Myocardial Infarction. *Cardiol Res*. 2011;2(40):27–35.
10. Carvajal P. Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Rev Clínica Periodoncia, Implantol y Rehabil Oral*. 2016;9(2):177–83.
11. Hegde R, Awan KH. Effects of periodontal disease on systemic health. *Disease-a-Month*. 2019;65(6):185–92.
12. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *Sci World J*. 2020;2020.
13. Koo H, Allan R, Howlin R, Hall- Stoodley L, Stoodley P. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Physiol Behav*. 2018;176(1):139–48.
14. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, William Costerton J, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: Impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(1):193–213.
15. G CCB, A MPG, M YDR, Huertas MG. Biopelículas bacterianas en heridas crónicas Bacterial biofilms in chronic wounds Biopelículas bacterianas em

- feridas crónicas Introducción. Rev salud bosque. 2019;9(1):47–61.
16. Khoury ZH, Vila T, Puthran TR, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Melo MAS, et al. The Role of Candida albicans Secreted Polysaccharides in Augmenting Streptococcus mutans Adherence and Mixed Biofilm Formation: In vitro and in vivo Studies. Front Microbiol. 2020;11(February):1–14.
 17. Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: A review. Med Mycol. 2018;56(6):653–67.
 18. Jenkinson HF. Beyond the oral microbiome. Environ Microbiol. 2011;13(12):3077–87.
 19. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. J Periodontal Res. 2011;46(2):252–60.
 20. Vieira Colombo AP, Magalhães CB, Hartenbach FARR, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. Microb Pathog. 2015;94:27–34.
 21. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: Candida albicans and Candida dubliniensis colonize the periodontal pockets. Med Mycol. 2008;46(8):783–93.
 22. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. PLoS Pathog. 2010;6(1).
 23. Monteiro-Da-Silva F, Araujo R, Sampaio-Maia B. Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. Med Mycol. 2014;52(5):496–503.
 24. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. Biomed Pharmacother. 2018;99(January):883–93.
 25. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. Dent Clin North Am. 2017;61(2):199–215.
 26. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral Microbiome of Deep and Shallow Dental Pockets In Chronic Periodontitis. PLoS One. 2013;8(6):2–11.
 27. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. J Clin Periodontol. 2017;44:S12–22.
 28. Jordana F, Susbielles L, Colat-Parros J. Periimplantitis and implant body roughness: A systematic review of literature. Implant Dent. 2018;27(6):672–81.
 29. Thurnheer T, Bostanci N, Belibasakis GN. Microbial dynamics during

- conversion from supragingival to subgingival biofilms in an in vitro model. *Mol Oral Microbiol.* 2016;31(2):125–35.
30. O'Donnell LE, Millhouse E, Sherry L, Kean R, Malcolm J, Nile CJ, et al. Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(7):1–14.
 31. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections – an update. *Apmis.* 2017;125(4):376–84.
 32. Jiao Y, Hasegawa M, Inohara N. The role of oral pathobionts in dysbiosis during periodontitis development. *J Dent Res.* 2014;93(6):539–46.
 33. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134–44.
 34. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(3):196–205.
 35. Sardi JCO, Duque C, Mariano FS, Marques MR, Höfling JF, Gonçalves RB. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. *Med Mycol.* 2012;50(1):43–9.
 36. Lohse M, Gulati M, Johnson A, Nobile C. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(1):19–31.
 37. Negrini T de C, Koo H, Arthur RA. *Candida*–Bacterial Biofilms and Host–Microbe Interactions in Oral Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1197:119–41.
 38. Arzmi MH, Alnuaimi AD, Dashper S, Cirillo N, Reynolds EC, McCullough M. Polymicrobial biofilm formation by *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii*, and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain and medium dependent. *Med Mycol.* 2016;54(8):856–64.
 39. Wu T, Cen L, Kaplan C, Zhou X, Lux R, Shi W, et al. Cellular components mediating coadherence of *Candida albicans* and *Fusobacterium nucleatum*. *J Dent Res.* 2015;94(10):1432–8.
 40. Bartnicka D, Karkowska-Kuleta J, Zawrotniak M, Satała D, Michalik K, Zielinska G, et al. Adhesive protein-mediated cross-talk between *Candida albicans* and *Porphyromonas gingivalis* in dual species biofilm protects the anaerobic bacterium in unfavorable oxic environment. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–13.
 41. Montelongo-Jauregui D, Srinivasan A, Ramasubramanian AK, Lopez-Ribot JL. An in vitro model for oral mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus gordonii* in synthetic saliva. *Front Microbiol.* 2016;7(MAY):1–13.
 42. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol.* 2013;28(2):83–101.

43. Sztukowska MN, Dutton LC, Delaney C, Ramsdale M, Ramage G, Jenkinson HF, et al. Community Development between *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* Mediated by InlJ and Als3. 2018;9(2):1–16.
44. Montelongo-Jauregui D. Contributions of *Candida albicans* Dimorphism , Adhesive. 2019;(June):1–15.
45. Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontol* 2000. 2010;52(1):38–52.
46. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):7–9.
47. Jakubovics NS. Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *J Mol Biol*. 2015;427(23):3662–75.
48. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(13):4092–7.
49. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio*. 2014;5(4):1–13.
50. Chimenos-Küstner E, Schemel-Suárez M, Robledo-Ramos C. Xenobiotics: Oral and systemic pathological implications. *Piel*. 2018;33(8):507–12.
51. Bowen WH, Koo H. Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011;45(1):69–86.
52. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biología de los Microorganismos*. Décima edi. Madrid: Pearson/Pretince Hall; 2004. 146–147 p.
53. Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques*. 1997;23(4):648–50.
54. Goldman E, Green LH. *Practical Handbook of Microbiology*. Second edi. Boca Raton: CRC Press; 2009. 17–18 p.
55. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018;22(1):35–45.
56. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):380–407.
57. Cuénod A, Foucault F, Pflüger V, Egli A. Factors Associated With MALDI-TOF Mass Spectral Quality of Species Identification in Clinical Routine Diagnostics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11(March):1–15.
58. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass

- spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal.* 2019;27(2):404–14.
59. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods Mol Biol.* 2017;1601:1–17.
 60. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. *Cell Viability Assays. Assay Guid Man.* 2004;(Md):1–25.
 61. Zhou Y, Wang S, Zhou X, Zou Y, Li M, Peng X, et al. Short-time antibacterial effects of dimethylaminododecyl methacrylate on oral multispecies biofilm in vitro. *Biomed Res Int.* 2019;2019.
 62. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol.* 2012;29(4):214–22.
 63. Young T, Alshanta OA, Kean R, Bradshaw D, Pratten J, Williams C, et al. *Candida albicans* as an essential “keystone” component within polymicrobial oral biofilm models? *Microorganisms.* 2021;9(1):1–23.
 64. Allkja J, Bjarnsholt T, Coenye T, Cos P, Fallarero A, Harrison JJ, et al. Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates. *Biofilm.* 2020;2(November 2019):100010.
 65. Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res.* 2018;97(4):371–80.
 66. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016;221(10):657–66.
 67. Ge MC, Kuo AJ, Liu KL, Wen YH, Chia JH, Chang PY, et al. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017;50(5):662–8.
 68. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis.* 2007;115(8):891–9.
 69. Hope CK, Wilson M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods.* 2006;66(3):390–8.
 70. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among Oral Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):486–505.