



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Evaluación antibacterial del compuesto dialil disulfuro y aceites esenciales sobre especies de la biopelícula oral formada in situ.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN PERIODONCIA E IMPLANTOLOGÍA

P R E S E N T A:

LAURA GABRIELA DOMINGUEZ VALADEZ

TUTOR: Dr. VÍCTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ

ASESOR: Dra. MIRYAM MARTÍNEZ HERNÁNDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Evaluación antibacterial del compuesto dialil disulfuro y aceites esenciales sobre especies de la biopelícula oral formada *in situ*.

Domínguez Valadez Laura G*, Miryam Martínez Hernández***, Adriana P. Rodríguez Hernández**** García Pérez Víctor Irahuen**

Objetivo:

Evaluar los cambios en las cuentas de especies bacterianas de la biopelícula oral formadas sobre superficies de hidroxiapatita posterior a la interacción de una solución con base base el compuesto de dialil disulfuro y aceites esenciales *in situ*.

Método:

Se evaluaron las cuentas de especies bacterianas de la biopelícula mediante hibridación DNA-DNA posterior a la interacción del compuesto de dialil disulfuro y aceites esenciales sobre la biopelícula *in situ*. Se utilizaron 3 superficies de hidroxiapatita por paciente durante 48 horas en cavidad oral en 5 pacientes con salud periodontal y gingival.

Resultados:

El conteo total del grupo control presentó mayores cuentas bacterianas totales con una media de $267.19(x 10^5 \pm SEM)$, seguido del grupo de aceites esenciales con una media de $233.60(x 10^5 \pm SEM)$, finalmente, el grupo de dialil disulfuro obtuvo el conteo más bajo con una media de $156.59(x 10^5 \pm SEM)$. Se mostró una reducción de cuentas bacterianas totales del 58.6% entre el grupo control y el grupo dialil disulfuro ($p=0.07$). Las especies individuales *S.anginosus*, *S. intermedius*, *S. sanguinis* mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p=0.05$).

Conclusiones:

Se desarrollo un modelo de biopelícula *in situ* (48hrs) con un enfoque cercano a su crecimiento y maduración fisiológica en la evaluación a la interacción con compuestos antimicrobianos. Se demostró la efectividad del compuesto de dialil disulfuro contra bacterias de la biopelícula oral *in situ*. Lo que sugiere que puede ser un compuesto con potencial uso en la disminución de la biopelícula oral

Palabras clave

Dialil disulfuro, biopelícula, *in situ*, aceites esenciales, Hibridación DNA-DNA.

Abstract.

Objective: To evaluate the changes in the structure of the oral biofilm following the interaction of a solution based on the solution of diallyl disulfide and essential oils *in situ*.

Methods:

Bacterial species counts in the biofilm were evaluated by DNA-DNA hybridization following the interaction of the solution of diallyl disulfide and essential oils on the biofilm *in situ*. Six hydroxyapatite surfaces per patient were used for 48 hours in the oral cavity in 5 patients with periodontal and gingival health.

Results:

The total count of the control group presented higher total bacterial counts with

a mean of 267.19(x 105 ± SEM), followed by the essential oils group with a mean of 233.60(x 105 ± SEM), finally, the solution of diallyl disulfide group obtained the lowest count with a mean of 156.59(x 105 ± SEM). A reduction of total bacterial counts of 58.6% was shown between the control group and the solution of diallyl disulfide group (p=0.7). The individual species *S.anginosus*, *S. intermedius*, *S. sanguinis* showed a statistically significant difference (p=0.5).

Conclusions:

An *in situ* biofilm model (48hrs) was developed with a close approach to its growth and physiological maturation in the evaluation of interaction with antimicrobial compounds. The effectiveness of solution diallyl disulfide against oral biofilm bacteria *in situ* was demonstrated. Which suggests that it may be a compound with potential use in reducing the biofilm *in situ*.

Keywords

Diallyl disulfide, biofilm, *in situ*, essential oils, DNA-DNA hybridization.

*Domínguez Valadez Laura Gabriela.

Residente de Posgrado, Facultad Odontología, UNAM

***Miryam Martínez Hernández

Laboratorio de Biointerfases, Facultad Odontología, UNAM

****Adriana P. Rodríguez Hernández

Laboratorio de Genética Molecular, Facultad Odontología, UNAM

**García Pérez Víctor Irahuen.

Laboratorio de Biointerfases, Facultad Odontología, UNAM

Introducción

Hoy en día, la salud periodontal se define como la ausencia de inflamación clínicamente detectable, aunque existe un nivel biológico de vigilancia inmunológica que es consistente con la homeostasis y la salud gingival clínica.

(1) Estudios han demostrado que la transición de la salud a la enfermedad sigue los principios de sucesión ecológica primaria, con cambios en la abundancia de especies autóctonas, en lugar de la adquisición de organismos más nuevos en la biopelícula bacteriana. (2, 3, 4). En cavidad bucal, la placa dentobacteriana es un clásico ejemplo de biopelícula bacteriana adherente que se forma en todos los tejidos duros y blandos, es el principal agente etiológico de enfermedades orales como caries y enfermedades periodontales.(5) La formación de biopelícula bacteriana en un sujeto sano se produce primero supragingivalmente, la cual progresa subgingivalmente. La superficie de un diente sometido a profilaxis inicial se cubre con una película de saliva, la cual se sabe influencia la adhesión bacteriana (6). Estas bacterias consisten principalmente en células cocoides Gram-positivas que se dividen y forman microcolonias. Después de unos días de crecimiento de la biopelícula bacteriana, las bacterias filamentosas se coagregan a los colonizadores iniciales y se incrustan en una matriz compuesta por componentes salivales y altas proporciones de exopolisacáridos de origen bacteriano (7). La formación de biopelículas representa un modo de crecimiento protegido, lo que origina menor susceptibilidad de las células bacterianas a los antimicrobianos y a la

destrucción por los mecanismos efectores inmunitarios del huésped y, por lo tanto, permite que los patógenos sobrevivan en entornos hostiles y también se dispersen y colonicen nuevos nichos. Se estima que residen más de 700 especies en cavidad oral **(8)**. La biopelícula supragingival (sobre el esmalte dental adyacente a la encía) contiene, en relación con su maduración y grosor, una mezcla de especies facultativas y anaerobias, provocando una inflamación gingival inespecífica (gingivitis) de acuerdo a la presencia de colonización bacteriana, predominan las especies del género *Streptococcus* y son reemplazadas con el tiempo por las especies de *Actinomyces* **(9,10,11,12,13)**. También se han observado especies como *C. gracilis*, *S. noxia* y *C. ochracea*, *P. intermedia* y *P. nigrescens*, así como ciertas fusobacterias, y aunque en menor cantidad, se han observado *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* **(14)**.

Existe evidencia sustancial de que varios métodos mecánicos y químicos de control de la biopelícula dental pueden prevenir la gingivitis **(15,16)**. La forma más eficaz para control de las biopelículas y prevención de la gingivitis ha sido mediante la interrupción física y eliminación de forma mecánica con el uso de cepillos dentales, dispositivos para la limpieza interdental y cepillos de dientes eléctricos. Sin embargo, se ha estudiado que aunado a esto, es importante el uso de agentes químicos en sujetos que no logran un control adecuado de la técnica de cepillado **(17)**. Entre las diferentes alternativas de control químico encontramos diferentes compuestos, entre ellos la clorhexidina (CHX) el cual ha demostrado una gran efectividad antibacteriana, sin embargo, presenta efectos secundarios en largos periodos de tiempo de uso, como decoloración marrón de los dientes, así como de algunos materiales de restauración y del dorso de la lengua, también se ha reportado que provoca alteración en el gusto y erosión en la mucosa bucal, entre otras. **(18,19,20,21)** Otra alternativa de los compuestos comerciales más empleados en la actualidad son los compuestos fenólicos esenciales, que actúan alterando la pared celular, inhiben enzimas bacterianas. No obstante, el pH del producto es bajo (pH 4,3) y se ha demostrado *in vitro* e *in situ* que provoca erosión de la dentina y el esmalte respectivamente **(22,23,24)**.

Debido a esto, se han buscado distintas alternativas, como agentes derivados de origen natural, dentro de las alternativas estudiadas se encuentra el compuesto de dialil disulfuro (DAS) el cual, es un tioéter lipofílico derivado de la alicina oxidada del género *Allium sativum* que pertenece a la familia *Rutaceae*. Esta familia comprende más de 200 especies, la cual, se ha descrito que puede ser eficaz en diversos padecimientos como bronquitis, problemas gastrointestinales, posee propiedades antimicrobianas, exhibe un efecto antioxidante y estimula el sistema inmunológico del cuerpo. Por otra parte, específicamente el compuesto de dialil disulfuro, ha demostrado que tiene actividad antibacteriana de amplio espectro eficaz contra una amplia gama de bacterias bucales Gram negativas y Gram positivas. **(25,26)**.

En ensayos preclínicos, se ha demostrado que inhibe la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y minimiza el daño celular inducido por el oxígeno. Sangeeta et. Al. Realizaron el primer estudio donde concluyeron que el enjuague bucal de extracto de DAS se puede utilizar al como una alternativa al enjuague bucal de clorhexidina al no presentar toxicidad *in vitro*. La solución de dialil disulfuro en una concentración de 3% reduce los recuentos de patógenos periodontales como *S. mutans salivar*, sin efectos adversos en

cavidad bucal con resultado favorable **(27,28)**. También se ha demostrado que DAS exhibe una actividad antibacteriana significativa contra *A. actinomycetemcomitans*. Como se ha descrito anteriormente, aunque hay estudios del efecto antibacterial del compuesto de dialil disulfuro derivado de *Allium sativum* sobre especies bacterianas planctónicas *in vitro*, los estudios sobre su efecto sobre la microbiota organizada en biopelícula es limitado o nulo. **(29,30)**.

Por tanto, uno de los objetivos del presente trabajo es desarrollar un modelo de biopelícula *in situ* para evaluar la posterior a la interacción y efecto de una solución de dialil disulfuro.

Métodos

Se seleccionaron 5 pacientes de manera aleatorizada que cumplieran con los criterios de inclusión con una media de 25.4 años de edad, todos mexicanos. Los criterios de inclusión fueron ausencia de sangrado al sondaje en < 10% de sitios, eritema y edema, que el paciente no presentara síntomas de enfermedad periodontal o gingivitis, tampoco pérdida ósea o profundidades de sondaje ≤ 3 mm. Todos se diagnosticaron con salud gingival en un periodonto intacto según lo establecido por la Nueva Clasificación de Enfermedades Periodontales del 2018 **(31)**.

A los pacientes se les dio el consentimiento informado, una vez habiéndolo leído y firmado se les enseñó la técnica de cepillado por un examinador, y se les explicaron las indicaciones a seguir; las cuales consistían en mantener el dispositivo en boca por 48 horas, solo podrían retirarlo al comer colocándolo en una superficie húmeda por un máximo de 30min. La higiene oral sería 3 veces al utilizando cepillo dental únicamente, se indicó evitar cualquier dentífrico o agente químico como coadyuvante. Una vez aceptadas y entendidas la explicación, se tomaron impresiones con alginato de la arcada superior de cada paciente, se confeccionó un dispositivo tipo guarda con un acetato del no. 40 con un espesor de 1 mm. Se realizaron 3 cavidades por la parte vestibular entre canino-primer premolar, primer premolar-segundo premolar y primer molar-segundo molar bilateral.

Se colocó una base de polivinilsiloxano en cada lado del dispositivo, sobre esta se adhirieron por retención 3 superficies de hidroxiapatita en forma de disco, y se pidió colocar en boca para iniciar las 48 horas. Al terminar el tiempo se toman las para ser procesadas.

Hibridaciones DNA-DNA – Análisis microbiota

Se determinó la proporción de cada especie dentro de las biopelículas utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky, Smith et al. 1994); Las superficies de hidroxiapatita fueron transferidas a un pozo de una caja de cultivo estéril, con 2ml según los diferentes grupos; compuesto de dialil disulfuro, aceites esenciales y agua bidestilada estéril, respectivamente. Posteriormente se llevaron a la centrifuga a 200rpm durante 5 minutos a una temperatura de 35°C. Al terminar el tiempo, cada superficie se colocó en 200µl de TE mezclado con 200µl de hidróxido de sodio, y posteriormente se les realizaron 3 lavados con PBS, al terminar, las superficies se colocaron en un pozo estéril con 1.5 ml de TE pH 7.5 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) para ser sonicadas 5 veces en períodos de 5 segundos cada uno. El siguiente paso fue tomar 150 µl del sobrenadante y se colocaron

en tubos individuales, donde se realizó micro-centrifugación de 1.5mL. cada uno contenía 100 µl de NaOH (0.5 M, Sigma) y las muestras fueron dispersadas. Los tubos fueron hervidos durante 10 min. y el pH neutralizado con 800 µl de acetato de amonio (5 M, Sigma). El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abierto de un minislot-30, concentrado y fijado en una membrana de nylon de carga positiva de 15x15cm mediante entrecruzamiento con luz ultravioleta seguido por incubación a 120°C durante 20 min, a su vez se le colocaron dos canales de estándares microbiológicos con mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos.

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante 1 hora en solución de hibridación que contenía 50% de formamida, 5x citrato salino estándar (SSC) (1x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0), 1% caseína, 5x solución Denhardt, 25 mM fosfato de sodio (pH 6.5) y 0.5mg/ml de RNA de levadura (Roche). Para el proceso de obtención de sondas de DNA, las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Estas, fueron rehidratadas en caldo para Mycoplasma y cultivadas en agar enriquecido a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂. Las sondas de DNA genómicas fueron preparadas para las 30 especies bacterianas mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique). Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración de 20 ng/ml en solución de hibridación (45% formamida, 5x SSC, 1x solución Denhardt, 20mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2mg/ml de RNA de levadura, 10% sulfato de dextrano y 1% caseína), colocadas en canales de hibridación individuales del miniblotter-45 e hibridadas una noche a 42° C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar evaporación de las sondas de DNA. Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20 min. a 68° C en buffer de fosfato (0.1x SSC y 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación. Fueron bloqueadas mediante su incubación durante 1 hora en amortiguador bloqueador que contenía 1% de caseína en buffer de maleato (100mM ácido maleico, 150mM NaCl, pH 7.5). Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (cdp-star, Roche) a 37 °C durante 1 hora; Las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35 min. Las películas fueron reveladas y posteriormente fueron fotografiadas con cámara digital (Kodak Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.). Con un sistema digital de foto documentación (Digidoc. Biorad) se enviaron a un programa (Quantity One. Biorad).

Ética

El comité de Investigación y Ética, reunido el día 1o de diciembre de 2020 a las 12:00, en la decimocuarta sesión ordinaria del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología, y estando presentes miembros del CIEFO. Formato de consentimiento informado y carta de consentimiento informado. CIE/1111/08/2020.

Estadísticas

Las cuentas bacterianas de los perfiles microbianos se describieron como la media (ME) \pm el error estándar de la media (EEM). Los análisis para determinar las diferencias en la viabilidad de la biopelícula así como las cuentas bacterianas en las superficies analizadas, se llevaron a cabo mediante la prueba de t- de Student.

Resultados

El total de población evaluada fueron $n=5$. En los resultados del conteo total de especies bacterianas, observamos que el grupo que presentó mayores cuentas bacterianas totales fue el grupo control de agua estéril con una media de 267.19 de las cuentas bacterianas totales ($\times 10^5 \pm \text{SEM}$), seguido del grupo de aceites esenciales con una media de 233.60 de las cuentas bacterianas totales ($\times 10^5 \pm \text{SEM}$), y el grupo de dialil disulfuro obtuvo un conteo más bajo de especies presentes con la media de 156.59 de las cuentas bacterianas totales ($\times 10^5 \pm \text{SEM}$). Se mostró una reducción de cuentas bacterianas totales del 58.6% entre el grupo control y el grupo de dialil disulfuro. La diferencia estadística de cuentas bacterianas totales entre grupo Control vs grupo dialil disulfuro fue de ($p=0.07$). Como se observa en la figura 1.

Específicamente, respecto a la cuentas bacterianas individuales, se observó una mayor reducción en el grupo de dialil disulfuro con respecto al grupo control en las especies *A. georgiae* (0.82 vs 3.42), *A. israeli* (0.00 vs 0.66), *C. ochracea* (0.18 vs 0.71) *E.corrodens* (2.09 vs 4.79), *F. alocis* (0.18 vs .74) *P.micra* (4.42 vs 11.51), *P. intermedia* (0.00 vs 24.25), *S. anginosus* (5.41 vs 11.28), *S. gordonii* (10.09 vs 25.38), *S. intermedius* (1.93 vs 6.14), *S. oralis* (2.74 vs 7.73), *S. sanguinis* (3.73 vs 9.18), *S. noxia* (0.03 vs 0.18), como se observa en la figura 2.

Por otra parte, se observó reducción de más de 50% en el grupo de dialil disulfuro de las cuentas bacterianas individuales en comparación con el grupo de aceites esenciales en las especies *E. corrodens*, *F.alocis*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *S. sanguinis*. Así mismo en la mayoría de las especies tuvo ligera reducción el grupo de dialil disulfuro con respecto al grupo de aceites esenciales.

Por otra parte, las especies que no fueron detectadas en ninguno de los análisis por hibridación en ninguno de los grupos fueron *C. showae*, *P. endodontalis*. Sin embargo, la especie *P. intermedia* se presentó únicamente en el grupo control, lo que indica que los grupos antibacteriales la eliminaron. A diferencia de *P. nigrescens* el cual solo se detectó en el grupo de aceites esenciales.

Las especies bacterianas individuales que presentaron diferencia estadísticamente significativa en el grupo dialil disulfuro comparadas con el grupo control fueron *S. anginosus* 11.28 vs 5.41, *S. Intermedius* 6.14 vs 1.93 y *S. sanguinis* 9.18 vs 3.73 ($p=0.05$).

Discusión

Las biopelículas son importantes porque algunas especies residentes contribuyen al mantenimiento de un equilibrio en la salud bucal así también, existen especies potencialmente patógenas. Existen estudios de biopelículas *in situ* con diferentes métodos, sin embargo, se debe aplicar una metodología “no perturbadora” en el estudio de cualquier agente antimicrobiano para no alterar la relación entre las células, la matriz extracelular y el sustrato.

Los estudios *in situ* son la forma más cercana al *in vivo* de la formación del biopelícula, y podría ser el método ideal para lograr un mejor conocimiento y control de la enfermedad.

En el presente estudio *in situ* utilizamos un dispositivo específico para el crecimiento de la biopelícula oral en un ambiente normal adherido a la superficie de los dientes y evaluamos el efecto antimicrobiano del compuesto de dialil disulfuro contra bacterias de especies representantes de la biopelícula subgingival. (*T. denticola*, *T. forsythia*, *S. Intermedius*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *P. intermedius*, *P. nigrscens*, *P. gingivalis*, *A. naeslundii*).

Autores han evaluado la biopelícula en términos de maduración a partir de las 4h. Antes de este tiempo, posiblemente existan bacterias adheridas a la película adquirida. Hay estudios *in situ* sobre biopelícula oral utilizando un dispositivo específico para su crecimiento y han analizado pellicel adquirido a 2h, otros autores han analizado UFC desde los primeros 10 min, o han aplicado técnicas FISH a los 30 min (26, 27,28). En nuestro estudio dejamos crecer la biopelícula por 48 horas, sabiendo que es el mínimo necesario para tener la maduración de la biopelícula propiamente dicha y no solo con los colonizadores primarios.

En este estudio analizamos el efecto antibacterial sobre biopelícula mediante su interacción de soluciones con base del compuesto de dialil disulfuro, comparando con un compuesto antibacterial a base de aceites esenciales. El compuesto de dialil disulfuro es un tioéter lipofílico derivado de la alicina oxidada del género *Allium sativum* que pertenece a la familia *Rutaceae*. El *Allium sativum* se compone de varios metabolitos biológicamente activos como aliina, alinasa, alicina, S-alicisteina, dialil disulfuro y alilmetiltrisulfuro.

Existen estudios en diversas áreas de la medicina incluyendo cavidad oral donde la inhibición del crecimiento bacteriano y la actividad bactericida se atribuyen a la alicina y los tiosulfatos. Además, se ha informado que las especies de *Allium* y sus compuestos relacionados tienen varias actividades biológicas que incluyen actividades anticancerígenas, antiateroscleróticas, antihipertensivas, así mismo se informó que la ingesta frecuente de ajo promueve las actividades antioxidantes internas y reduce los efectos adversos oxidativos, aumentando la síntesis de antioxidantes endógenos o reduciendo la producción de oxidantes como las especies de radicales libres de oxígeno.

(29). También se ha observado que su actividad antiinflamatoria se debe a la inhibición de la emigración de granulocitos neutrófilos al epitelio, antibacterianas contra bacterias grampositivas y gramnegativas resistentes a los antibióticos, como *Shigella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *S. faecalis*, *S. pyogenes*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella aerogenes*, antifúngicas, la actividad antiviral de los extractos de ajo ha sido evaluada contra la influenza B, el rinovirus

humano tipo 2, el citomegalovirus humano (HCMV), el herpes simple tipo 1 y 2. (30).

Específicamente, se evaluaron los cambios en las cuentas de especies bacterianas de la biopelícula posterior a la interacción de una solución a base de la solución de dialil disulfuro y aceites esenciales *in situ*. Al ser considerada la biopelícula oral como agente causal necesario en infecciones orales como la enfermedad periodontal.

Bakri et al. Realizaron la primera descripción de una evaluación de la actividad frente a diferentes especies orales *in vitro* con bacterias planctónicas o libres. Al igual que nuestro estudio, ellos estudiaron las especies *S. gordonii*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. intermedius*, *S. anginosus*, *A. naeslundii*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis* y posibles patógenos periodontales, entre otras, en el cual confirmaron el efecto antibacterial de la alicina contra una gama de especies Gram-negativas orales como *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivais*, *P. intermedia* (35.7—1.1 mg/ml de ajo; 0.4—13.7 mg/ml alicina) En conjunto, los patógenos periodontales putativos probados tenían concentración mínima inhibitoria más bajos que los otros organismos probados. A diferencia de nuestro estudio, en el cual evaluamos diferentes especies de *Streptococcus*, como *S. noxia*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, en las cuales tuvimos una disminución importante del 50% al 30% del conteo de bacterias. (35)

Por otra parte, a diferencia de bacterias planctónicas, en las biopelículas se forma una capa de exopolisacáridos alrededor de las bacterias adheridas. Se ha observado que la capa de peptidoglucano en la envoltura de las células Gram-positivas podría dificultar el acceso de la alicina a la membrana, porque observaron que las especies Gram-negativas probadas, *P. gingivalis* y *P. intermedia*, fueron particularmente sensibles al extracto de ajo, las cuales se considera que juegan un papel patogénico tanto en la periodontitis como en las infecciones dentoalveolares.

En contraste, en el presente estudio hubo una disminución estadísticamente significativa en especies Gram positivas *S. anginosus*, *S. intermedius* y *S. sanguinis*. Estas especies forman parte del complejo amarillo, se encuentran dentro de las primeras bacterias en colonizar la superficie dental, así como, cocos facultativos grampositivos. La colonización inicial se caracteriza por una unión transitoria y reversible al diente. Son organismos que colonizan preferentemente las superficies de los dientes poco después de la erupción de los dientes y posteriormente tienen interacción con especies relacionadas con el desarrollo de gingivitis y enfermedad periodontal. (27)

En este estudio coincidimos en la disminución de la especie *P. gingivalis* que mostró más de la mitad de reducción al contacto con el grupo de dialil disulfuro en cuentas bacterianas individuales con respecto al grupo control. Esta especie es un componente prominente del microbioma oral, así como un colonizador del epitelio oral que puede invadir localmente los tejidos periodontales y evadir los mecanismos de defensa del huésped. Al hacerlo, utiliza un panel de

factores de virulencia que provocan la desregulación de las respuestas inmunitarias e inflamatorias innatas, de esta forma contribuye a la patogenia de la periodontitis al inducir altos niveles de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β e IL-6 por parte de las células auxiliares T CD4+ periféricas. Es importante su reducción porque el lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* circula sistémicamente en más del 50% de los pacientes con enfermedad periodontal. **(31)**

En estudios previos se ha demostrado que la alicina pueden ser un agente terapéutico potencial para la periodontitis porque muestra una actividad significativa contra los patógenos y sus proteasas. En contraste a nuestro estudio con el compuesto de dialil disulfuro, donde las especies grampositivas, específicamente la especie *S. sanguinis* fue una de las especies donde se demostró una reducción con diferencia estadísticamente significativa en cuentas bacterianas individuales del grupo control con el grupo de **(32)**.

Por otro lado, al momento de realizar evaluación respecto a la concentración, estudios han mostrado su actividad antibacteriana de cuatro concentraciones diferentes de extracto de ajo (5%,10%, 20% y 100%) contra *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *P. aeruginosa* y *Lactobacillus* spp. Se ha observado que las zonas de inhibición de las diferentes concentraciones de extracto de ajo no fueron significativamente diferentes para las especies evaluadas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. salivarius* **(33)**.

En este estudio la concentración utilizada en el presente estudio, fue de 80 μ g/ml de dialil disulfuro para la formación en biopelícula *in situ*, lo que reportó actividad antibacteriana de relevancia para la mayoría de las especies probadas.

Un número limitado de estudios ha investigado los efectos antibacterianos del extracto de ajo contra la microbiota de la biopelícula dental humana. Groppo et al. observado una notable reducción de *S. mutans* después de hacer enjuagues con una solución con ajo al 2,5% **(34)**. Posteriormente Chavan et al. Realizaron el primer estudio con alicina en dos fases contra *S. mutans*, el cual, es uno de los principales factores etiológicos de la caries dental en cavidad oral. Evaluaron el efecto antibacterial de dialil disulfuro como enjuague bucal específicamente con la especie *S. mutans*. En comparación, nuestro estudio evaluó la eficacia antibacteriana de dialil disulfuro contra especies de la biopelícula oral adheridas sobre una superficie de hidroxiapatita expuesta a cavidad oral sin embargo, la formación de biopelícula fue durante 48hrs y la interacción con la solución de dialil disulfuro fue durante con una concentración de 80 μ g/ml. Al igual que el estudio previo, se demostró la eficacia del dialil disulfuro contra especies gram positivas (31).

Asimismo, un estudio evaluó el efecto antibacterial del compuesto de dialil disulfuro contra un periodontopatógeno como *A. actinomycetemcomitans*, y demostró un efecto antimicrobiano significativo sin efecto citotóxico a su concentración terapéutica *in vitro*. Igualmente en nuestro estudio las muestras fueron crecidas en el medio ambiente oral fisiológico con saliva, demostramos

su disminución en 42% en el grupo de aceites esenciales, ya que se ha visto que el dialil disulfuro es termoestable y sus propiedades antibacterianas no se ven afectadas por la presencia de saliva (35).

De manera importante los resultados antibacteriales fueron sobre un número limitado de especies, sin embargo, nosotros en nuestro análisis llevamos a cabo uno de los primeros estudios *in situ* con el mismo resultado que estudios previos al evaluar la eficacia del dialil disulfuro en 40 especies en el conteo de especies bacterianas representativas de la biopelícula oral y de especies periodontopatógenas como (36). *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*, *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *E. corrodens*, *E. nodatum*, *F. periodonticum*, *P. micra*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *S. gordonii*, *S. intermedia*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, entre otras.

El dialil disulfuro es un compuesto de origen natural que no se ha reportado tener efectos secundarios y se demostró en este estudio que tiene mayor eficacia en la reducción de especies de la biopelícula oral *in situ*. (37)

Conclusiones

Se desarrollo un modelo de biopelícula *in situ* para su evaluación con un enfoque cercano a su crecimiento y maduración fisiológica. En este estudio se observó una reducción de cuentas bacterianas totales del grupo de dialil disulfuro podemos poner especies totales e individuales. Se ha demostrado que el dialil disulfuro ha sido efectivo en disminuir bacterias representantes de la biopelícula oral *in situ*. Pudiendo ser una alternativa para el control de especies bacterias específicas en la biopelícula oral.

Agradecimientos

Dra. Ruth Rincón por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

Referencias

- 1.Chapple ILC, Mealey BL, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J.Periodontol.* 2018;89:S74–S84.
- 2.Kistler JO, Booth V, Bradshaw DJ, Wade WG. Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS One.* 2013; 8: e71227.
- 3.Huang S, Li R, Zeng X, et al. Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota. *ISME J.* 2014; 8: 1768– 1780.
- 4.Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S44–S67.

5. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89:S159– S172.
6. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 196–205.
7. Max. A. Llistgarten. The structure of dental plaque. *Periodontology* 2000, Vol. 5, 1994, 52-65.
8. K Krishnan, T Chen, BJ Paster. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases* (2017) 23, 276–286
9. Bernimoulin J-P: Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 7–9.
10. Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, van Houte J. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontol* 1977;12: 90–106.
11. Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1967;12:1561–1568.
12. Zee KY, Samaranayake LP, Attstrom R. Predominant cultivable supragingival plaque in Chinese “rapid” and “slow” plaque formers. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 1025– 1031.
13. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97:1311–1318.
14. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135–187.
15. Giri, D. K. Effectiveness between two tooth brushing methods on removing dental plaque. *Journal of Nobel Medical College*, 2018;7(1), 26–29.
16. Fine, D. H. Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *American Journal of Dentistry*. 1988;1:259–263.
17. Van der Weijden F, Slot DE. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontol* 2000. 2011;55(1):104-123.
18. Van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol* 2005; 6: 214–228.
19. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, Whelton H, Riley P. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017.

20. Flotra, L., Gjermo, P., Rolla, G. & Waerhaug, J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 1971;79:119–125.
21. Keller J, Verkade H, Timmerman M, et al. Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthwashes. *J Periodontol* 2003;74:214.
22. Addy, M., Loyn, T. & Adams, D. Dentine hypersensitivity: Effects of some proprietary mouthwashes on the dentine smear layer. *Journal of Dentistry*. 1991;19:148–152.
23. Pontefract, H., Hughes, J., Kemp, K., Yates, R., Newcombe, R.G. & Addy, M. The erosive effects of some mouth rinses on enamel. A study *in situ*. *Journal of Clinical Periodontology*. 2001;28:319–324.
24. Van Leeuwen, Slot, Van der Weijden. Essential Oils Compared to Chlorhexidine With Respect to Plaque and Parameters of Gingival Inflammation: A Systematic Review. *J Periodontol*. February 2011.
25. Rahman K. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *J Nutr* 2001;131:977S–979S.
26. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmuller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2010) Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel *in situ*. *J Microbiol Methods* 81(2):166–174.
27. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB (2005) Effect of two antimicrobial agents on early *in situ* biofilm formation. *J Clin Periodontol* 32(2):147–152
28. Prada-López I, Quintas V, Vilaboa C, Suárez-Quintanilla D and Tomás I (2016) Devices for *In situ* Development of Non-disturbed Oral Biofilm. A Systematic Review. *Front. Microbiol*. 7:1055
29. El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, G Wasef L, Elewa YHA, Al-Sagan A, Abd El-Hack ME, Taha AE, M Abd-Elhakim Y, Prasad Devkota H. Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. *Nutrients*. 2020 Mar 24;12(3):872
30. Elnima EI, Ahmed SA, Mekkawi AG, Mossa JS. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie* 1983;38:747–748.
31. Rahman K. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *J Nutr*. 2001;131:977S–979S.
32. Yang, Cnhabra, Hong, Smith. Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *J Nutr*. 2001 Mar;131 (13s):1041S-5S.
33. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014;2014:476068.

34. Chavan SD, Shetty NL, Kanuri M. Comparative evaluation of garlic extract mouthwash and chlorhexidine mouthwash on salivary *Streptococcus mutans* count in vitro study. *Oral Health Prev Dent*. 2010;8(4):369-74.
35. Bakri, I. M., and C. W. Douglas. 2005. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 50:645-51.
36. Houshmand, B.; Mahjour, F.; Dianat, O. Antibacterial effect of different concentrations of garlic (*Al-liumsativum*) extract on dental plaque bacteria. *Indian J. Dent. Res.* 2013, 24, 71.
37. Groppo FC, Ramacciato JC, Motta RH, Ferraresi PM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. *Int J Dent Hyg* 2007;5:109-15
38. Velliyagounder, Kabilan, Ganeshnarayan, Krishnaraj, Velusamy, Senthil Kumar, Fine, Daniel H. In Vitro Efficacy of Diallyl Sulfides against the Periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012 May; 56 (5): 2397-2407.
39. Zakaria EA. The inhibitory action of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria. *Eur Food Res Technol* 2004;218:460–464.
40. Quintas, V., Prada-López, I., Prados-Frutos, J.C. *et al.* In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. *Clin Oral Invest* 19, 97–107 (2015)
41. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmuller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2010) Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods* 81(2):166–174.
42. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB (2005) Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol* 32(2):147–152

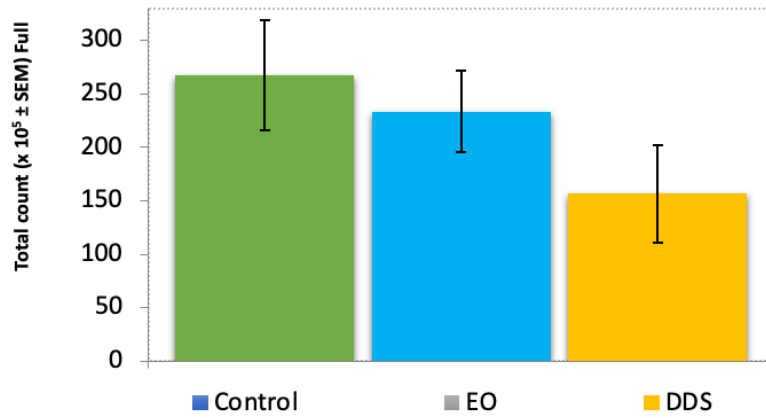
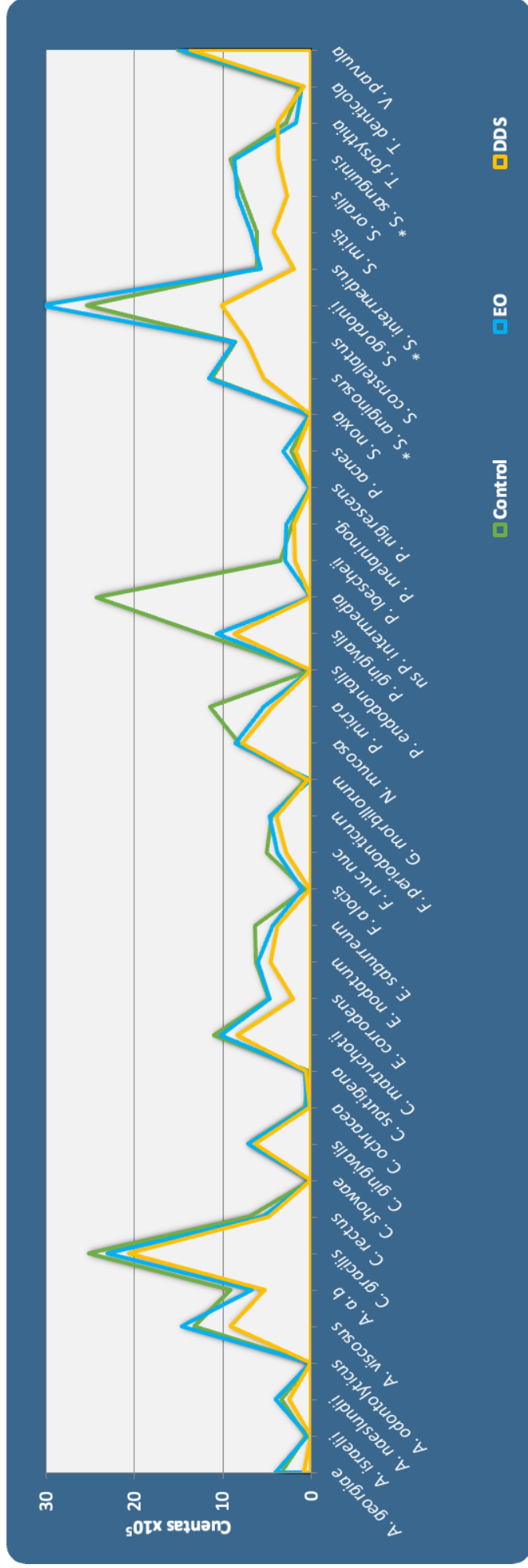


Figura 1
Resultados cuentas totales bacterianas ($\times 10^5 \pm \text{SEM}$) de grupo control, y grupos experimentales EO y DDS. Grupo control vs DDS $p= 0.07$

	Grupo control		Grupo EO		Grupo DDS	
	Media	EEM \pm	Media	EEM \pm	Media	EEM \pm
<i>Especie</i>						
<i>A. georgiae</i>	3.42	1.88	4.03	1.70	0.82	0.63
<i>A. israelii</i>	0.66	0.66	0.41	0.41	0.00	0.00
<i>A. naeslundii</i>	3.35	0.69	4.07	0.32	2.52	0.93
<i>A. odontolyticus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>A. viscosus</i>	13.27	2.62	14.64	2.09	9.11	1.46
<i>A. a. b</i>	9.09	1.90	6.74	1.47	5.27	2.07
<i>C. gracilis</i>	25.13	6.63	23.10	6.44	20.70	6.57
<i>C. rectus</i>	6.99	2.14	5.45	1.87	4.77	2.23
<i>C. showae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>C. gingivalis</i>	7.12	1.09	7.17	0.39	6.36	0.90
<i>C. ochracea</i>	0.71	0.71	0.44	0.44	0.18	0.18
<i>C. sputigena</i>	0.29	0.17	0.71	0.52	0.59	0.40
<i>C. matruchotii</i>	10.96	2.74	10.21	2.56	8.36	2.20
<i>E. corrodens</i>	4.79	2.82	4.65	2.05	2.09	0.77
<i>E. nodatum</i>	6.21	1.79	6.08	2.38	4.55	1.60
<i>E. saburreum</i>	6.33	2.18	4.40	1.39	3.83	1.91
<i>F. alocis</i>	0.74	0.50	1.00	0.61	0.18	0.18
<i>F. nuc nuc</i>	5.05	1.95	3.82	1.57	2.82	1.43
<i>F. periodonticum</i>	4.52	2.24	4.66	2.35	3.89	1.70

	Grupo control		Grupo EO		Grupo DDS	
	Media	EEM \pm	Media	EEM \pm	Media	EEM \pm
<i>Especie</i>						
<i>G. morbillorum</i>	0.65	0.65	0.09	0.09	0.44	0.44
<i>N. mucosa</i>	1.25	7.75	1.36	8.57	1.51	8.17
<i>P. micra</i>	11.51	7.99	5.41	1.88	4.42	3.24
<i>P. endodontalis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>P. gingivalis</i>	12.40	3.49	10.72	2.10	8.70	1.56
<i>ns P. intermedia</i>	24.25	24.25	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>P. loescheii</i>	3.45	1.30	2.94	1.18	1.86	0.88
<i>P. melaninog.</i>	2.12	0.84	2.80	1.22	1.97	1.03
<i>P. nigrescens</i>	0.00	0.00	0.22	0.22	0.00	0.00
<i>P. acnes</i>	2.24	1.41	3.16	2.14	1.69	1.53
<i>S. noxia</i>	0.18	0.18	0.19	0.16	0.03	0.03
<i>* S. anginosus</i>	11.28	1.94	11.58	2.48	5.41	1.86
<i>S. constellatus</i>	8.54	0.87	8.64	0.65	7.25	1.38
<i>S. gordonii</i>	25.38	8.82	30.61	10.74	10.09	9.14
<i>* S. intermedius</i>	6.14	1.34	5.72	1.93	1.93	1.48
<i>S. mitis</i>	6.18	1.87	6.75	2.18	4.21	1.96
<i>S. oralis</i>	7.73	2.69	8.34	2.46	2.74	2.15
<i>* S. sanguinis</i>	9.18	1.63	8.74	1.66	3.73	1.39
<i>T. forsythia</i>	2.79	1.81	1.66	1.27	3.79	3.79
<i>T. denticola</i>	1.27	1.27	1.03	0.89	0.86	0.86

	Grupo control		Grupo EO		Grupo DDS	
	Media	EEM \pm	Media	EEM \pm	Media	EEM \pm
<i>Especie</i>						
<i>V. parvula</i>	15.10	0.49	14.87	0.64	13.67	1.01
<i>Niveles totales</i>	267.19	51.48	233.60	37.84	156.59	45.45



Grafica
 Cuentas x10⁵ de 40 especies bacterianas. En color amarillo se muestra la gráfica del grupo experimental DDS, en color azul se muestra la gráfica del grupo experimental EO, en color verde se muestra la gráfica del grupo control.