



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



## FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE QUITOSANO Y  
DEL PÉPTIDO LL-37 SOBRE LAS CEPAS DE IMPORTANCIA  
MÉDICO-ODONTOLÓGICA: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus  
faecalis*.

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**CIRUJANA DENTISTA**

P R E S E N T A:

MARIANA CHÁVEZ ESPARZA

TUTORA: Dra. MIRYAM MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias a los recursos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, Clave: **IA206522** e **IN206723**.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, claves: **IA206522** e **IN206723**, por los recursos otorgados para la realización del presente proyecto de investigación.

Al laboratorio de Biointerfases en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la UNAM, por el préstamo de sus instalaciones y equipos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Miryam Martínez Hernández, por apoyarme y guiarme en la realización de este trabajo. Usted se ha convertido en una inspiración para mí desde el primer día. Le agradezco el conocimiento compartido, su tiempo y su confianza.

Al Dr. Gonzalo Montoya Ayala, por su ayuda y asesoría para la realización de este trabajo. Le agradezco sus consejos y tiempo compartido.

A mis padres, Martha y Jaime, por todo su esfuerzo y sacrificio para ayudarme a cumplir esta meta. Gracias por creer en mí cuando yo no lo hacía y motivarme en todo momento, siempre serán mi inspiración, los amo. Gracias por seguir aquí pa, espero que la vida nos regale más tiempo juntos.

A mis hermanos, que confiaron en mí para ser mis primeros pacientes. Gracias infinitas por su gran apoyo y compañía, en las buenas y en las malas. Sin ustedes esto no sería posible.

A la familia Colibrix. Les agradezco su apoyo a lo largo de estos años. Ojalá pudiera regresarles un poco de todo lo que han hecho por mí. Los aprecio mucho.

A mis amigas, que siempre estuvieron conmigo cuando más lo necesitaba. Sin su compañía, este camino habría sido mucho más difícil. Gracias por toda su ayuda y por crear recuerdos increíbles que vivirán por siempre en mi memoria.

A Polet, por ser uno de mis más grandes apoyos en este proceso. Mis miedos se hicieron más pequeños cuando nuestros caminos se juntaron. Agradezco todos los momentos vividos a tu lado y espero que sigas siendo esa persona asombrosa, inspiradora y llena de curiosidad.

Al Verano Científico 2022, por mostrarme este maravilloso mundo de la ciencia y la investigación.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1 INTRODUCCIÓN .....	3
2 MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Ecología oral .....	5
2.2 Microbiota oral .....	6
2.3 Bacterias oportunistas.....	7
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
2.3.2 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	12
2.4 Biopolímeros .....	16
2.4.1 Quitosano .....	17
2.4.1.1 Acción antimicrobiana.....	17
2.5 Péptidos antimicrobianos .....	18
2.5.1 LL-37 .....	19
2.5.1.1 LL-37 en la cavidad oral.....	21
2.5.1.2 Acción antimicrobiana.....	22
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	23
4 JUSTIFICACIÓN.....	23
5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	24
6 HIPÓTESIS.....	24
7 OBJETIVOS.....	24
7.1 General.....	24
7.2 Específicos.....	25
8 MATERIALES .....	25
8.1 Recursos humanos: .....	25
8.2 Recursos materiales para el cultivo de microorganismos:.....	25

8.3	Recursos materiales las pruebas de inhibición bacteriana: .....	25
9	DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA .....	26
9.1	Compuestos evaluados.....	26
9.2	Prueba de actividad antibacteriana en placas de agar (Antibiograma). .....	27
9.3	Prueba de actividad antibacteriana en caldo. ....	28
9.4	Análisis estadístico.....	28
10	RESULTADOS .....	30
10.1	Efecto antibacteriano de quitosano y el péptido LL-37 sobre cepas de <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i> en cultivos en placas de agar (antibiogramas).....	30
10.2	Efecto antibacteriano de quitosano y el péptido LL-37 sobre cepas de <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i> en cultivos en caldo.....	31
11	DISCUSIÓN .....	34
12	CONCLUSIONES.....	38
13	BIBLIOGRAFÍA.....	40

## RESUMEN

La cavidad oral alberga una microbiota constituida por más de 774 diferentes especies bacterianas agrupadas en biopelículas, que en disbiosis se asocian con el desarrollo de infecciones orales. En la actualidad se conoce que las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* forman parte de biopelículas orales y presentan una alta resistencia a fármacos antibacterianos. El uso de biopolímeros (quitosano) y péptidos (LL-37) con características antimicrobianas representan una alternativa para disminuir el desarrollo de infecciones asociadas con la colonización de dichas bacterias patógenas.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto antibacteriano de quitosano y del péptido LL-37 sobre las cepas de importancia médica-odontológica: *S. aureus* y *E. faecalis*. La evaluación del efecto antibacteriano de los compuestos: quitosano gel 1%, quitosano gel 2% y LL-37 se llevó a cabo mediante pruebas de sensibilidad bacteriana (antibiogramas) y mediante cultivos en caldo. Para las pruebas de sensibilidad bacteriana en agar se realizó la siembra en pasto de las dos especies bacterianas en diferentes cajas de Petri, donde se colocaron discos de papel Whatman, cada disco fue embebido individualmente en los diferentes compuestos experimentales; clorhexidina al 0.20 % fue incluida como control positivo, mientras que agua bidestilada estéril fue incluida como control negativo. Cada una de las cepas fue incubada a 35°C durante 24 horas, para posteriormente medir los halos de inhibición de cada disco embebido en los diferentes grupos experimentales. La prueba antibacteriana en caldo se realizó en placas de 96 pozos con cada uno de los compuestos a evaluar ajustado a la concentración correspondiente; cada una de las placas de cultivo fue incubada en aerobiosis en una cámara Cleaver a 35 °C durante 24 horas, bajo agitación constante. Posteriormente, cada una de las placas de cultivo celular fue medida en un lector de microplacas a OD 600 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

**Palabras clave:** Efecto antibacteriano; Quitosano; Péptido LL-37; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*.

## ABSTRACT

The oral cavity presents a microbiote constituted by over 774 bacterial species grouped in biofilms, which in dysbiosis are associated with the development of oral infections. It is currently known that *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* bacteria are part of oral biofilms and are highly resistant to antibacterial drugs. The use of biopolymers (chitosan) and peptides (LL-37) with antimicrobial characteristics represents an alternative to reduce the development of infections associated with the colonization of these pathogenic bacteria.

The purpose of the present study was to evaluate the antibacterial effect of chitosan and the peptide LL-37 against the strains of medical-dental importance: *S. aureus* and *E. faecalis*. The antibacterial effect of the compounds: chitosan gel 1%, chitosan gel 2% and LL-37 was evaluated by bacterial sensitivity tests (antibiograms) and broth cultures. For the bacterial sensitivity tests on agar, the two bacterial species were grown in different Petri dishes, where Whatman paper discs were placed, each disc was individually embedded in the different experimental compounds; 0.20% chlorhexidine was included as a positive control, while sterile double distilled water was included as a negative control. Each of the strains was incubated at 35°C for 24 hours to subsequently measure the inhibition halos of each disk embedded in the different experimental groups. The antibacterial test in the broth was performed in 96-well plates with 100 µL of each of the compounds to be evaluated and 100 µL of each bacterial species; each of the culture plates was incubated in aerobiosis in a Cleaver chamber at 35 °C for 24 hours, under constant agitation. Subsequently, each cell culture plate was evaluated in a microplate reader at OD 600 nm. All assays were performed in triplicate.

**Keywords:** Antibacterial effect; Chitosan; LL-37 peptide; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*.



# 1 INTRODUCCIÓN

La cavidad oral aloja a una microbiota compleja constituida por más de 774 diferentes especies bacterianas, que colonizan superficies biológicas y no biológicas <sup>1</sup>. La microbiota oral se ve afectada por diversas determinantes ecológicas <sup>2</sup>, de forma que cuando entra en desequilibrio, suele relacionarse con la aparición y desarrollo de enfermedades orales infecciosas como la caries, enfermedades periodontales y periimplantarias <sup>3</sup>. En general, las bacterias pueden encontrarse, dentro de la cavidad oral en estado planctónico u organizadas en biopelículas <sup>4</sup>. Esta compleja organización bacteriana se relaciona con la evasión de la respuesta inmune y la resistencia antimicrobiana <sup>5</sup>.

Socransky y cols. agruparon a los microorganismos de la biopelícula subgingival en “complejos microbianos”, de los cuales destaca el complejo rojo, debido a su alta correlación con la patogenia de la enfermedad periodontal <sup>6</sup>. Además de los complejos descritos originalmente por Socransky y cols., en diversos estudios se menciona que bacterias oportunistas como *S. aureus* y *E. faecalis* también se encuentran relacionadas con el desarrollo de procesos infecciosos orales <sup>7</sup>.

Debido a los factores de virulencia que expresan las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis*, y además de que poseen la capacidad de formar biopelículas complejas <sup>8,9</sup>, en la actualidad se han estudiado alternativas a los tratamientos habituales para el control de su crecimiento mediante el uso de biopolímeros y biomoléculas con propiedades antimicrobianas.

El quitosano es un biopolímero reconocido como antimicrobiano por su naturaleza catiónica, que interactúa con las cargas negativas de la membrana bacteriana y provoca lisis celular <sup>10</sup>. Por otro lado, LL-37 es un péptido modulador de la respuesta inmune, que posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana <sup>11,12</sup>.

Por todo lo anterior, el objetivo principal del presente trabajo es evaluar el efecto antibacteriano del quitosano y del péptido LL-37 sobre dos cepas de importancia médica-odontológica: *S. aureus* y *E. faecalis*.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Ecología oral

La cavidad oral representa un ecosistema complejo donde diversos microorganismos de la microbiota oral colonizan las superficies biológicas y no biológicas disponibles <sup>2</sup>. La microbiota oral es una de las más complejas comunidades microbianas en el cuerpo humano, esta se encuentra constituida por más de 774 diferentes especies bacterianas <sup>1</sup>, de las cuales, más del 50% colonizan la bolsa periodontal, y las especies restantes se distribuyen en otros sitios de la cavidad oral <sup>13</sup>.

La colonización microbiana dentro la cavidad oral depende de las determinantes ecológicas del sitio como: concentración de oxígeno, temperatura, características anatómicas, disponibilidad de nutrientes y exposición a factores inmunológicos <sup>14</sup>, los sitios disponibles para dicha colonización incluyen el surco gingival, los dientes, lengua, mejillas, paladar y amígdalas <sup>2</sup>.

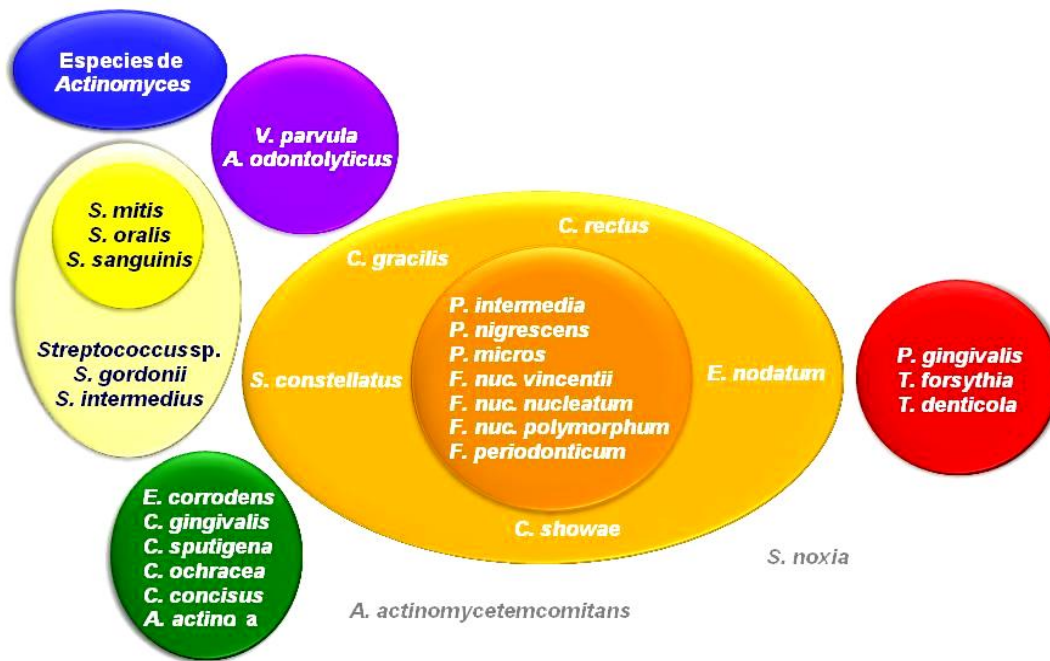
En general, existen dos tipos de vida bacteriana en la cavidad oral: las bacterias planctónicas (libremente suspendidas) y las organizadas en biopelículas (adheridas a una superficie embebidas en una matriz polimérica). El paso de un estado planctónico a biopelícula confiere ciertas ventajas ecológicas a estos microorganismos, como la evasión de la respuesta inmune, resistencia al estrés oxidativo, compensación por falta de nutrientes y resistencia antimicrobiana <sup>4</sup>. Varios estudios demuestran que la formación de biopelículas depende de factores como la movilidad de los microorganismos, la síntesis de polisacáridos, las condiciones ambientales (oxígeno, temperatura, pH) y disponibilidad de nutrientes <sup>15 15 16</sup>.

Las biopelículas bacterianas han sido asociadas, en su estado disbiótico, con el desarrollo de dos de las enfermedades orales más prevalentes en el mundo, caries y enfermedad periodontal <sup>3</sup>. La disbiosis se define como un desequilibrio entre los microorganismos patógenos y no patógenos de la microbiota residente <sup>17</sup>. Las alteraciones

en las dinámicas de la comunidad microbiana oral desempeñan un papel determinante en la disbiosis de las biopelículas orales <sup>18</sup>.

## 2.2 Microbiota oral

Los microorganismos que forman parte de la microbiota oral se organizan en forma de biopelículas complejas. Al respecto, Socransky y cols. en 1988, encontraron que los microorganismos de la biopelícula subgingival se asocian entre ellos formando complejos, a los cuales nombraron “complejos microbianos de la biopelícula subgingival”, identificados por los siguientes colores: amarillo, azul, verde, morado, naranja y rojo, siendo las bacterias del complejo rojo consideradas como bacterias periodontopatógenas (**Figura 1**) <sup>6</sup>.



**Figura 1.** Complejos microbianos Fuente Socransky et al., 1998.

Los miembros del complejo amarillo, morado y verde son considerados colonizadores primarios o tempranos de la cavidad oral, que permiten la sucesión de los colonizadores del complejo naranja, que actúan como "puente" para el complejo rojo o colonizadores tardíos. El aumento en la proporción, principalmente del complejo rojo,

provoca cambios patológicos, que dan lugar a daños en las estructuras orales, manifestándose clínicamente como enfermedades periodontales <sup>19</sup>.

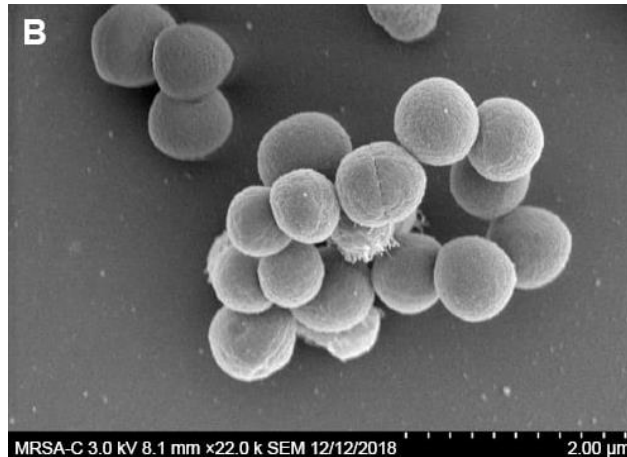
### **2.3 Bacterias oportunistas**

Además de las bacterias asociadas en los complejos bacterianos descritos inicialmente por Socransky y cols., se sabe que bacterias consideradas como oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *E. faecalis* también han sido relacionadas con procesos infecciosos orales como periodontitis, periimplantitis e infecciones endodóncicas <sup>7</sup>.

*S. aureus* ha sido aislado de la biopelícula dental, lesiones cariosas y bolsas periodontales, además ha sido asociada con formas de severas de periodontitis y periimplantitis <sup>8, 20</sup>. Por otro lado, *E. faecalis* es aislada con frecuencia de conductos radiculares con tratamientos endodóncicos fallidos, además, representa la tercera causa más común de infecciones nosocomiales <sup>21</sup>. También ha sido encontrada en periodontitis crónica refractaria, aunque su relación con ésta sigue siendo poco clara <sup>22</sup>.

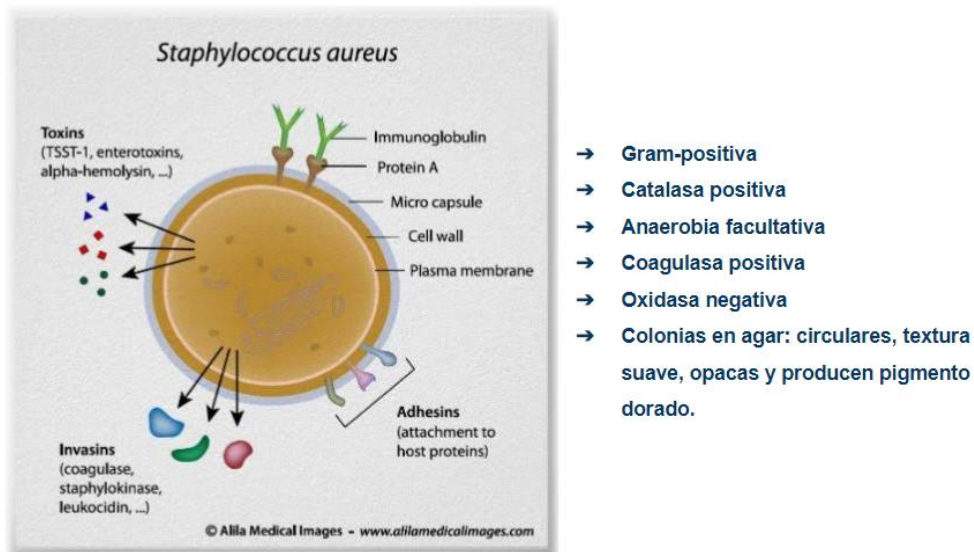
#### **2.3.1 Staphylococcus aureus**

*S. aureus*, del griego *staphyle* que significa racimo de uvas. Fue aislada por primera vez en 1880 por el médico escocés Alexander Ogston. Es una bacteria con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , no móvil, no esporulada, generalmente no encapsulada y agrupada formando racimos de uvas (**Figura 2**) <sup>23</sup>.



**Figura 2.** Micrografía obtenida por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de agrupaciones en racimos de uvas típicas de *Staphylococcus aureus*.<sup>24</sup>.

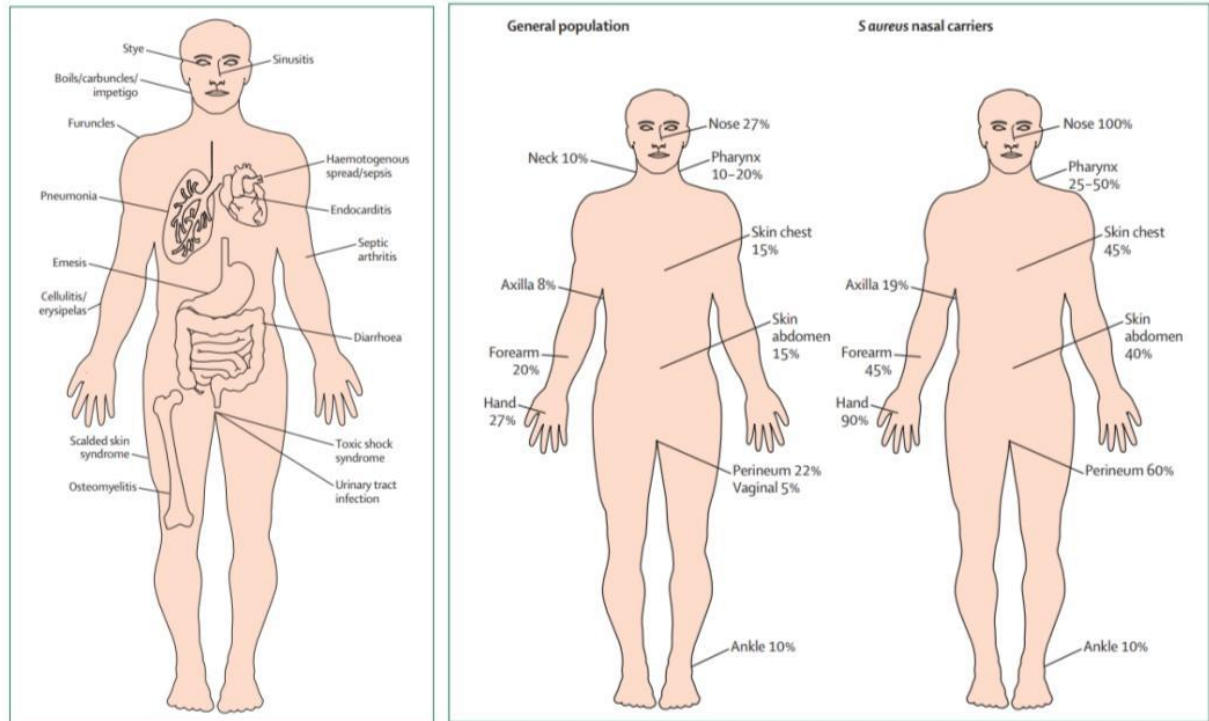
*S. aureus* es una bacteria Gram-positiva, catalasa positiva, anaerobia facultativa. Sus colonias crecidas en agar se observan circulares, de textura suave, opacas y con un pigmento levemente dorado (**Figura 3**)<sup>25</sup>.



**Figura 3.** Características bioquímicas de *S. aureus*. Fuente propia.

*S. aureus*, en sus formas MRSA (Methicillin-Resistant *S. a*) y MSSA (Methicillin-Susceptible *S. a*), son frecuentemente aisladas en infecciones del torrente sanguíneo adquiridas en el ambiente hospitalario (infecciones nosocomiales)<sup>26</sup>; ambas formas tienen la capacidad de sobrevivir por meses en cualquier tipo de superficie, siendo las manos el principal vehículo de transmisión por contacto. El sitio más colonizado por *S. aureus* es la

mucosa nasal, seguida de la piel, el perineo y la faringe. Otros sitios que albergan a *S. aureus*, aunque con menor frecuencia, incluyen el tracto gastrointestinal, la vagina y las axilas (**Figura 4**)<sup>27</sup>.



**Figuras 4.** Algunas de las infecciones causadas por *S. aureus* (izquierda). Principales sitios de colonización de *S. aureus* y sus porcentajes de colonización en diferentes sitios anatómicos (derecha)<sup>28</sup>.

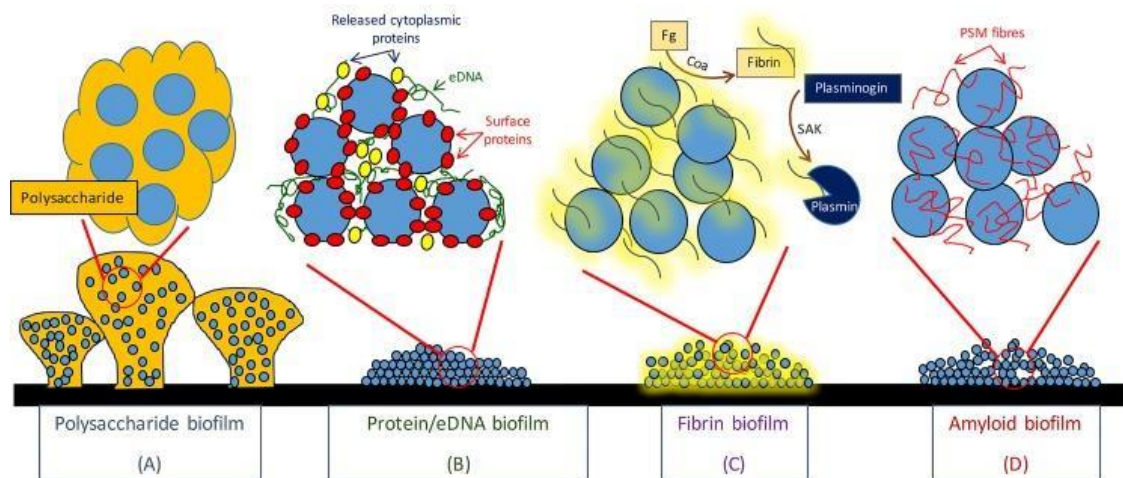
Para que *S. aureus* pueda colonizar sitios específicos del cuerpo humano, es necesario que la bacteria se adhiera a ciertos receptores del nicho, superar las defensas del huésped y posteriormente, propagarse en el organismo. Estudios longitudinales mencionan que aproximadamente el 20% de los individuos son portadores persistentes de *S. aureus* en la mucosa nasal, el 30% son portadores intermitentes y aproximadamente el 50% son no-portadores<sup>29</sup>. Por otra parte, los niños presentan tasas más altas de colonización persistente por esta bacteria (hasta 45%), sin embargo, dicha persistencia bacteriana disminuye con la edad<sup>30</sup>. Además, se ha reportado que la tasa de portadores de *S. aureus* varía entre grupos étnicos, siendo más alta en personas caucásicas; la

colonización nasal por esta bacteria es mayor en hombres, en pacientes inmunosuprimidos, con diabetes mellitus, VIH, obesidad, infecciones cutáneas y enfermedades de la piel. En general, se ha identificado que la hospitalización un importante factor de riesgo en la colonización con *S. aureus*<sup>28</sup>.

Se ha demostrado que existe una migración de *S. aureus* que va de las fosas nasales a la garganta o la cavidad oral<sup>31</sup>, en la cavidad oral suele colonizar sitios como la lengua, superficies dentales y bolsa periodontal, y la saliva,<sup>32</sup>. En el tracto oral, *S. aureus* se ha asociado con infecciones dentoalveolares y lesiones en la mucosa oral como la queilitis angular, parotiditis y mucositis, además de desempeñar un papel importante en el fracaso de los implantes dentales<sup>33</sup>. La colonización de *S. aureus* tiene tasas de hasta 84% en cavidades orales de adultos sanos y de 45% en adultos con prótesis dentales<sup>34</sup>. Sin embargo, a pesar del mayor conocimiento sobre el microbioma oral que tenemos en la actualidad, aún se desconocen los mecanismos subyacentes involucrados en las enfermedades orales asociadas con este microorganismo, así como del riesgo de propagación de la infección estafilocócica desde los reservorios orales a sitios corporales distantes<sup>35</sup>.

*S. aureus* es un microorganismo de difícil tratamiento debido a su fisiopatología y mecanismos de resistencia, como la formación de biopelículas, que involucra la formación de una matriz extracelular formada por proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, que la protegen del sistema inmune del huésped<sup>36</sup>. La formación de esta matriz polimérica protege a las biopelículas de los antibióticos<sup>23</sup>. Al respecto, las cepas de *S. aureus* organizadas en biopelículas pueden volverse fácilmente resistentes a los antibióticos, sobre todo a la meticilina (ejemplo: MRSA) (**Figura 5**)<sup>33</sup>.





**Figura 5.** Mecanismos de biopelícula de *S. aureus* <sup>37</sup>.

La amplia gama de factores de virulencia de *S. aureus* involucrados en el desarrollo de enfermedades infecciosas, pueden clasificarse en: factores asociados a la superficie; enzimas degradativas y toxinas superantigénicas. La diversidad y gran variabilidad de los genes que codifican estos factores de virulencia pueden afectar el curso de un proceso infeccioso <sup>38</sup>.

Como parte de los factores de virulencia asociados con su superficie se encuentran: *fnbA* y *fnbB*, las *fnBPs* (proteína A y B de unión a fibronectina) y el factor *clumping*, los cuales son proteínas que median la adhesión de *S. aureus* a los componentes de la matriz extracelular del huésped, como la colágena, la fibronectina (Fn), y el fibrinógeno (Fg) <sup>23, 36, 39</sup>.

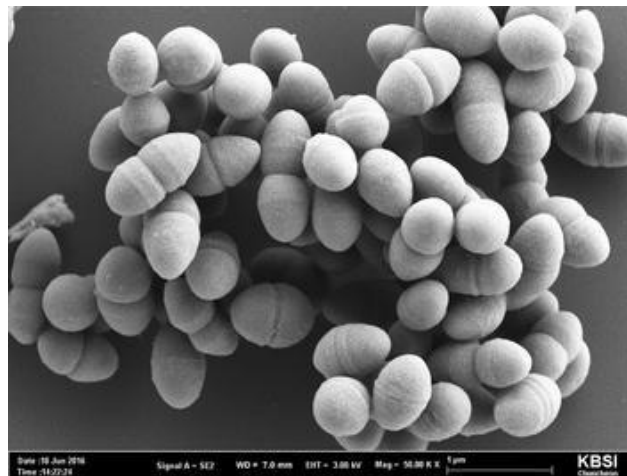
También, se han identificado hemolisinas como: alfa, beta, gamma, delta, sintetizadas por la mayoría de las cepas de *S. aureus*, que tienen capacidad hemolítica y citolítica, actuando sobre determinadas células del huésped, como leucocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos <sup>40</sup>. La hemolisina alfa disuelve las células y causa necrosis hemolítica; la hemolisina beta afecta al pulmón y a la córnea; la hemolisina gamma afecta neutrófilos, macrófagos y eritrocitos y se cree que tiene efecto en la inducción de la inflamación; mientras que la hemolisina delta, que se ha informado que se produce en el 97% de los aislados de *S. aureus*, actúa como surfactante disgregando las membranas

celulares, además de disolver las estructuras celulares internas de los glóbulos rojos y de otras células de mamíferos <sup>33</sup>.

Asimismo, *S. aureus* ha sido frecuentemente asociada con el desarrollo de infecciones en dispositivos biomédicos, al respecto, se ha descrito que la biopelícula formada por *S. aureus* sobre las superficies los implantes dentales de Titanio (Ti) es una de las principales causas del fracaso de estos dispositivos protésicos, presentando una afinidad por este material <sup>41, 42</sup>. Además, se reporta que *S. aureus* coloniza a más de la mitad de los implantes dentales y parece persistir sobre su superficie incluso después de tratar las periimplantitis con antibióticos y terapia mecánica periodontal <sup>43</sup>.

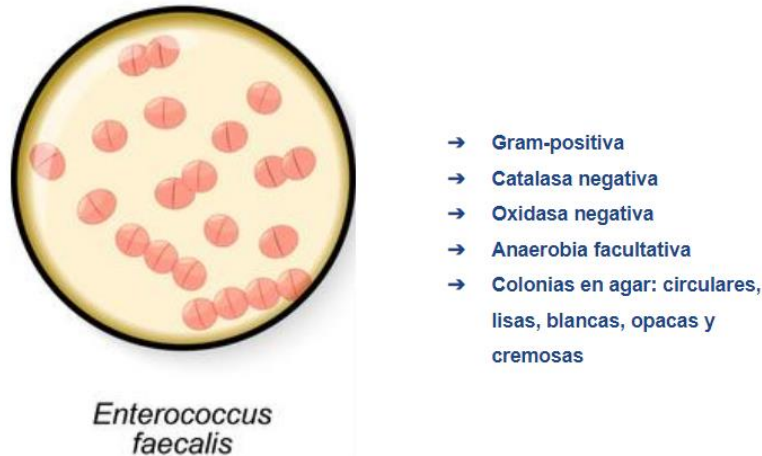
### 2.3.2 *Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* es una especie bacteriana en forma de cocos ovalados no móviles y no esporulados, con un diámetro que oscila entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$ , dispuestos en pares o cadenas cortas (**Figura 6**) <sup>45</sup>.



**Figura 6.** Micrografía de *E. faecalis* obtenida por MEB <sup>44</sup>.

*E. faecalis* puede formar colonias lisas, no transparentes, blancas o cremosas, en placas de agar. Es catalasa negativa, oxidasa negativa, Gram-positiva y anaerobia facultativa (**Figura 7**) <sup>45</sup>.

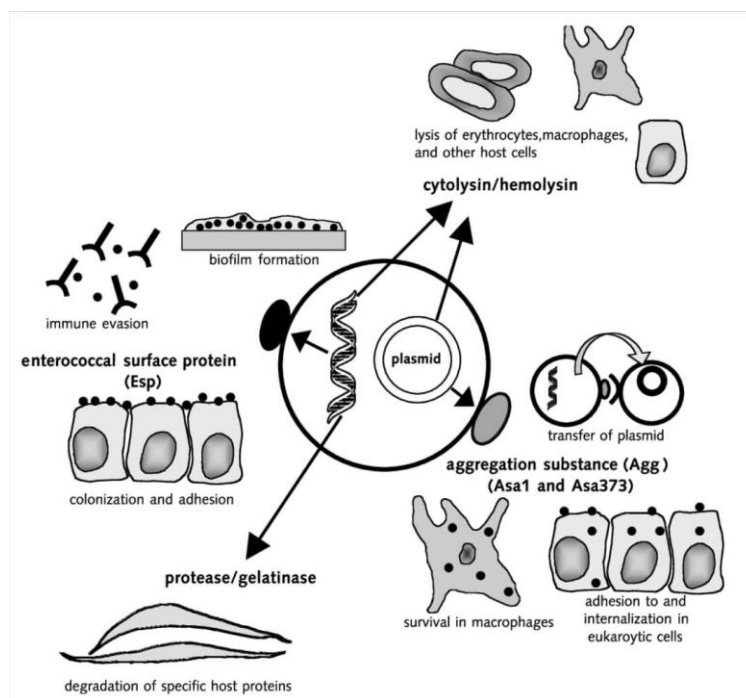


**Figura 7.** Características bioquímicas de *E. faecalis*. Fuente propia.

El género *Enterococcus* posee diferentes mecanismos para sobrevivir en condiciones desfavorables, como en un entorno con poco oxígeno, con un pH alcalino, en un amplio rango de temperaturas entre 10 y 60 °C, con una salinidad elevada, con limitación nutrientes, e inclusive en concentraciones de NaCl al 6.5% <sup>46</sup>. Es uno de los primeros colonizadores del intestino en niños desde la primera semana de vida, y se mantiene en el tracto gastrointestinal del 80% de los adultos, además, puede formar parte de la microbiota normal de la cavidad oral, encontrándose en hasta el 20% de los individuos sanos, y de la microbiota comensal de diversos animales, así como en las plantas, suelo y agua <sup>47</sup>. Puede transmitirse por contacto con el entorno contaminado y a través de alimentos. Debido a su capacidad para invadir las regiones extraintestinales por translocación <sup>48</sup>, *E faecalis* puede pasar de ser una bacteria comensal a patógena, por lo que es frecuentemente aislada de infecciones del tracto urinario, cuadros septicémicos, infecciones de heridas y múltiples sitios anatómicos, además de ser uno de los principales causantes de enfermedades nosocomiales <sup>9, 49</sup>.

Entre los factores de virulencia más estudiados de *E. faecalis* se encuentran: la sustancia de agregación, adhesinas de superficie, ácido lipoteicoico, superóxido extracelular, y las enzimas proteolíticas: gelatinasa, hialuronidasa y citolisina. *E. faecalis* es

capaz de sintetizar la proteína de superficie Esp, la cual se ha encontrado que favorece la adhesión celular, la colonización y la evasión del sistema inmune. Además, es capaz de sintetizar una metaloproteasa extracelular, la gelatinasa (GelE), la cual hidroliza gelatina, colágena y hemoglobina del huésped. GelE contribuye a la adhesión bacteriana y a la formación de biopelículas complejas, además de regular la autólisis y liberación de ADN de alto peso molecular. Otro factor de virulencia es Asa1, que media la agregación entre bacterias y permite la transferencia de plásmidos. Además, posee la presencia del gen *cylA*, el cual se encarga de sintetizar una proteína implicada en la activación de la citolisina con acción lítica en varios tipos de células, de esta forma contribuyendo a la virulencia de *E. faecalis* (Figura 8) <sup>50, 51</sup>.



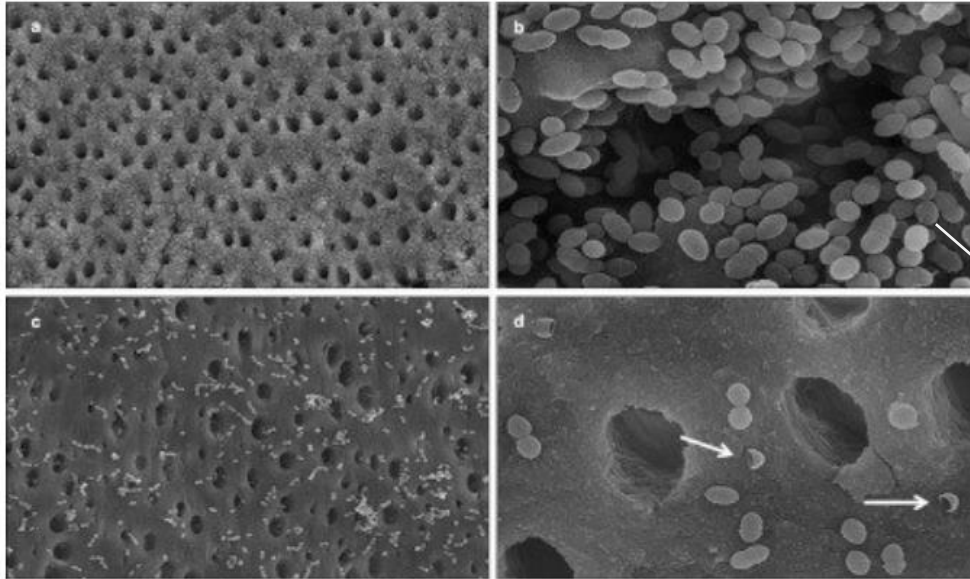
**Figura 8.** Factores de virulencia de *E. faecalis* <sup>52</sup>.

El ácido lipoteicoico (ALT) es un componente estructural de la pared de *E. faecalis*, y es considerado uno de los principales factores patógenos más importantes asociados a esta bacteria, ya que desencadena respuestas inflamatorias y provoca daños en los tejidos,

aumenta la resistencia bacteriana a los péptidos antimicrobianos, los antibióticos o los desinfectantes y actúa como receptor para la agregación en la formación de biopelículas <sup>53</sup>.

*E. faecalis* es capaz de adherirse irreversiblemente a superficies mediante la formación de una biopelícula que le confiere una resistencia adicional a los antibióticos <sup>9 54</sup>. El género *Enterococcus* es naturalmente resistente o tolerante a varios antimicrobianos <sup>55</sup>. La resistencia natural de *Enterococcus* incluye algunos fármacos como cefalosporinas, aminoglucósidos, macrólidos, sulfonamidas y clindamicina <sup>56</sup>. Sin embargo, puede ser potencialmente resistente a todos los antimicrobianos usados en infecciones humanas. Algunas cepas de *E. faecalis* se consideran dentro del grupo de las bacterias multirresistentes, es decir, resistentes a tres o más grupos de agentes antimicrobianos (MDR, multidrug-resistant por sus siglas en inglés). La resistencia que presenta *E. faecalis* a la vancomicina o a la teicoplanina suele ser preocupante debido al importante uso terapéutico de estos antimicrobianos contra infecciones por bacterias MDR <sup>57</sup>.

*E. faecalis* es considerado como el microorganismo más comúnmente asociado a las infecciones endodóncicas post-tratamiento, siendo el aislado bacteriano más comúnmente recuperado del conducto radicular <sup>50</sup>. Una mala técnica de irrigación y un sellado incompleto de los canales radiculares, permite que esta bacteria sobreviva y se esconda en los túbulos dentinarios <sup>58</sup>. La capacidad de *E. faecalis* de tolerar condiciones de estrés ambiental puede explicar su alta tasa de supervivencia a pesar del uso de medicamentos en el conducto radicular (**Figura 9**) <sup>59</sup>.



**Figura 9.** Imágenes por SEM de bloques de dentina infectados por *E. faecalis*. El grupo tratado con solución salina (a y b) que muestra un gran número de bacterias adheridas con membranas bacterianas intactas. El grupo tratado con clorhexidina (CHX) al 2% (c y d) muestra un número reducido de bacterias adheridas, además de células de *E. faecalis* lisadas <sup>60</sup>.

Por lo anterior, se han buscado alternativas diferentes para el control del crecimiento de estas cepas bacterianas. Los biopolímeros y biomoléculas con potencial antimicrobianos podrían representar una alternativa al uso de agentes terapéuticos antimicrobianos convencionales para eliminar este tipo de patógenos altamente resistentes <sup>61</sup>.

## 2.4 Biopolímeros

Los polímeros naturales o biopolímeros son materiales que proceden de diversos recursos naturales, como el almidón, la celulosa, el quitosano, y de proteínas de origen vegetal y animal. Se conoce como biopolímeros a las grandes macromoléculas formadas por numerosas unidades repetitivas <sup>62</sup>. Debido a sus características como ser biodegradables, biocompatibles, de bajo costo, gran abundancia y sostenibilidad, son útiles para diferentes aplicaciones, como películas comestibles, emulsiones, materiales de envasado en la industria alimentaria, y como materiales de transporte de fármacos, implantes médicos, andamios de tejidos y materiales de vendaje en la industria farmacéutica <sup>63</sup>. Aunque, en general, no suelen tener propiedades antibacterianas

intrínsecas (ya que se usan principalmente como vehículo para algunos fármacos), se ha demostrado que uno de estos biopolímeros, llamado quitosano, presenta capacidad antibacteriana intrínseca <sup>64</sup>.

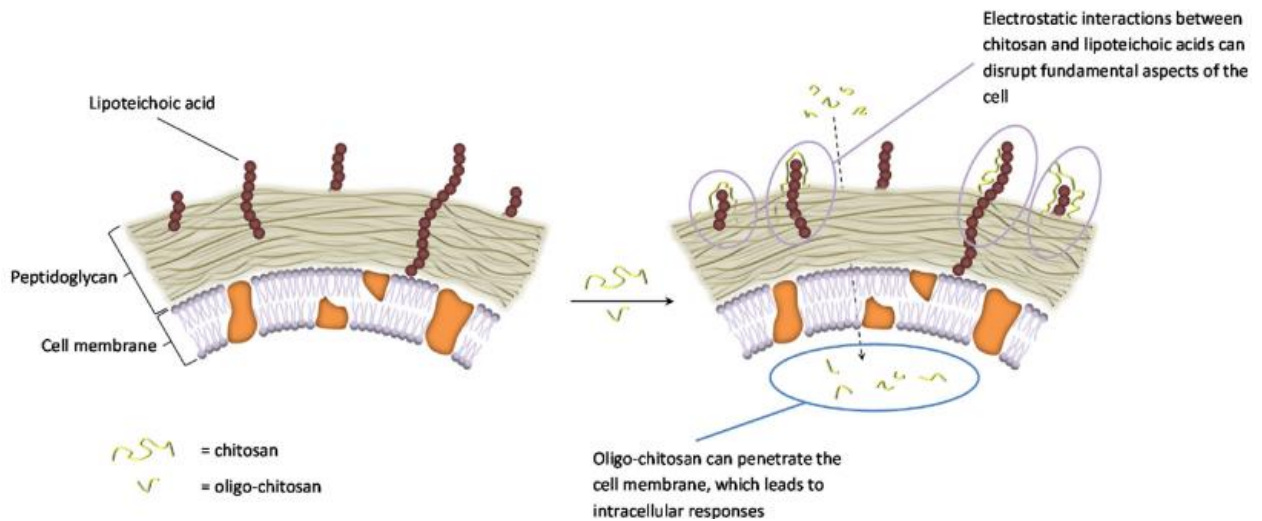
### **2.4.1 Quitosano**

El quitosano es un biopolímero natural o macromolécula, catalogado como el segundo más abundante en la naturaleza (después de la celulosa), de fácil obtención y bajo costo, comúnmente extraído de la desacetilación (química o enzimática, usando NaOH al 30-60%) de la quitina <sup>65</sup>, la cual es un componente extraído del exoesqueleto de crustáceos e insectos, de conchas marinas y en hongos. El quitosano presenta una estructura lineal, formada por unidades de glucosamina y N-acetil glucosamina unidas a través de enlaces glucosídicos <sup>66</sup>. Se ha descubierto que este biopolímero posee propiedades de biocompatibilidad, es biodegradable, no tóxico, antimicrobiano contra una gran variedad de microorganismos (bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, y hongos). Además, se ha demostrado que posee capacidades remineralizantes, mediante la inducción de la deposición de hidroxiapatita, y la nucleación de cristales de calcio y fosfato <sup>67</sup>. También presenta efecto hemostático, cicatrizante de heridas, regula la síntesis de fibroblastos y colágena para acelerar la formación de tejido de granulación, aumenta la proliferación de células epiteliales y acorta el tiempo de curación <sup>68</sup>. Otra función es que actúa como bioadhesivo, ya que al presentar una estructura porosa favorece la integración y vascularización del tejido, y provee una superficie química apropiada para la adhesión y diferenciación celular.

#### **2.4.1.1 Acción antimicrobiana**

La acción antimicrobiana del quitosano se atribuye a una interacción electrostáticas, entre cargas positivas de los grupos aminos del quitosano que interactúan con cargas

negativas de la pared bacteriana, alterando la permeabilidad celular y provocando la fuga de componentes proteicos intracelulares y lisis celular (**Figura 10**)<sup>10</sup>.



**Figura 10.** Modo de acción del quitosano contra bacterias Gram-positivas<sup>69</sup>.

La eficacia antibacteriana del quitosano se ve influida por diversos factores como son el tipo de microorganismo blanco, el peso molecular (bajo, medio o alto) del compuesto, el grado de desacetilación (que va de la quitina al quitosano), el pH del medio, la solubilidad, la hidrofiliidad del compuesto, etc<sup>69</sup>. Sin embargo, se ha observado que la actividad antibacteriana del quitosano aumenta a mayores temperaturas y a menor pH<sup>70</sup>. A pesar de que los efectos antibacterianos del quitosano puro y sus derivados llegan a ser inferiores a los de otros antimicrobianos comerciales, múltiples estudios han demostrado que el quitosano puro en combinación con otros fármacos podría representar una estrategia eficaz para mejorar sus propiedades antimicrobianas<sup>71,72</sup>.

## 2.5 Péptidos antimicrobianos

Es bien sabido que la destrucción tisular depende del equilibrio de los mecanismos de protección del huésped<sup>73</sup> y uno de los mecanismos del sistema inmune para controlar las infecciones orales es la producción de moléculas antimicrobianas. Los péptidos antimicrobianos (AMP's por sus siglas en inglés) son moléculas relativamente cortas, que



contienen entre 12 a 60 aminoácidos, catiónicas e hidrofóbicas, participan como medidores y moduladores de la respuesta contra patógenos y contribuyen de manera importante al mantenimiento del equilibrio entre la salud y la enfermedad mediante mecanismos antimicrobianos y actividad quimiotáctica <sup>74</sup>. Actualmente, se reconoce un grupo extremadamente diverso de péptidos antimicrobianos, hasta junio del 2022, en la web oficial Antimicrobial Peptide Database (APD), se tenían registrados por lo menos 3,425 AMP's que participan en la respuesta inmune innata de los organismos multicelulares en general <sup>75</sup>. En los seres humanos se han reconocido hasta la fecha 147 péptidos de defensa que son sintetizados en gránulos de los neutrófilos <sup>76</sup>. Entre sus principales funciones destacan el regular la homeostasis de la microbiota oral, modular a las células de la respuesta inmune y mejorar la cicatrización de heridas <sup>19</sup>.

Los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos para lograr sus diferentes funciones biológicas se pueden dividir en 3: objetivos extracelulares, incluyendo la inducción de daño a la membrana bacteriana por medio de la formación de poros, inhibición de la síntesis de la pared celular de peptidoglicano, alteración de la integridad de la membrana y la neutralización de los factores de virulencia bacterianos extracelulares; objetivos intracelulares, los cuales incluyen la interrupción de la síntesis y función de proteínas, inhibición de la función del ADN; y finalmente objetivos inmunológicos, como la inducción de la secreción de citoquinas quimiotácticas <sup>12,77</sup>.

### **2.5.1 LL-37**

Las catelicidinas son proteínas que actúan como moléculas precursoras de péptidos antimicrobianos tras su escisión proteolítica <sup>78</sup>. La catelicidina con mayor relevancia descrita en los humanos es la proteína hCAP, de la que se obtiene un péptido denominado LL-37, encontrado en la región C-terminal de la proteína. La secuencia de LL-37 consta de 37 aminoácidos e inicia con dos aminoácidos leucina-leucina (LL) en su

extremo N-terminal <sup>76</sup>. En un pH neutro, posee una carga total de +6, es de comportamiento anfipático y presenta afinidad por las membranas fosfolipídicas. LL-37 se conforma por una estructura  $\alpha$ -hélice (**Figura 11**) <sup>79</sup>.

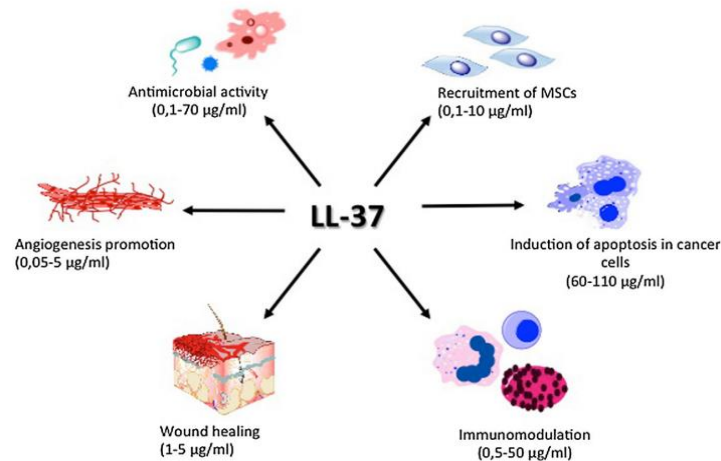
Human LL-37 **LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES**



**Figura 11.** Secuencia y estructura de representación en cinta del LL-37 humano (estructura de alta calidad determinada por espectroscopia de resonancia magnética nuclear 3D)

<sup>79</sup>.

LL-37 es el único péptido de la catelicidina descubierto en humanos, posee una amplia gama de propiedades como actividad antimicrobiana contra bacterias, virus, hongos y parásitos <sup>12</sup>. También es capaz de inhibir la formación de biopelículas bacterianas en microorganismos resistentes a tratamiento con antimicrobiano. El espectro de actividad de LL-37 incluye la activación de la proliferación celular, estimula la migración de células epiteliales y la promoción y cierre de heridas, contribuye con la homeostasis y regeneración de tejidos, regula la osteoclastogénesis y la resorción ósea, así como la osteogénesis y la formación ósea <sup>80</sup>; además, desempeña un papel como inductor de la angiogénesis (**Figura 12**) <sup>81</sup>.



**Figura 12.** Propiedades de LL-37 en relación con diferentes células y tejidos <sup>81</sup>.

LL-37 es capaz de promover el crecimiento tumoral, según el tejido de origen de las células cancerosas, ya que en varios tipos de cáncer se han observado diferencias en la expresión de este péptido. En células de cáncer de ovario, pulmón, mama y melanoma se muestra un aumento en su expresión, mientras que en cáncer gástrico y de colon disminuye la producción en esas células. Lo anterior implica que las acciones de LL-37 son específicas para cada tejido <sup>81</sup>.

### 2.5.1.1 LL-37 en la cavidad oral

La expresión oral de LL-37 es un factor importante para la homeostasis oral. Los péptidos de catelicidina se localizan en las glándulas salivales, el epitelio lingual y la mucosa palatina de ratones, y en el conducto submandibular en humanos. LL37 también estimula la migración de las células de la pulpa dental humana para aumentar la regeneración de los complejos pulpa-dentina a través de la activación del receptor de crecimiento epidérmico y las vías de señalización de la quinasa N-terminal y la secreción de factor de crecimiento endotelial vascular, actuando tanto en las células endoteliales como en las células pulpares para promover la angiogénesis y acelerar el proceso de cicatrización y curación de la lesión pulpar <sup>82</sup>. LL-37 posee un efecto antibiopelícula reduciendo la adhesión de las bacterias a la superficie dental, así como interfiriendo en el grosor de la biopelícula <sup>83</sup>. Es importante

destacar que el LL-37 proporciona un gran efecto inhibitor sobre las bacterias colonizadoras primarias, es decir, el complejo amarillo-naranja, mientras que el complejo rojo patógeno suele ser más resistente al LL-37, produciendo proteasas para inactivarlo <sup>74</sup>. LL-37 también permite la migración de los fibroblastos del periodonto al lugar de la inflamación, y estimula la liberación de IL-8, IL-6 y otros factores de crecimiento que estimulan la regeneración de los tejidos periodontales <sup>84</sup>.

#### **2.5.1.2 Acción antimicrobiana**

La mayoría de los efectos antimicrobianos directos de LL-37 se le atribuyen a su estructura  $\alpha$ -hélice y a sus propiedades catiónicas e hidrofóbicas. La hélice N-terminal se relaciona con la quimiotaxis y con la resistencia a la proteólisis, mientras que la hélice C-terminal es responsable de los efectos antimicrobianos. LL-37 recubre la membrana microbiana y la perfora, provocando la formación de poros y lisis celular. LL-37 se fija básicamente a las membranas celulares que contienen lipopolisacáridos (Gram-negativo), o ácido teicoico con carga negativa (Gram-positivo). Por otro lado, su acción antivírica se debe a su interacción con la envoltura de la membrana y la cápside proteica. Además, induce la autofagia en los monocitos/macrófagos humanos para destruir patógenos intracelulares <sup>11</sup>.

### **3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*S. aureus* y *E. faecalis* son dos de los microorganismos aislados en la cavidad oral con gran resistencia a tratamientos tradicionales; ambas bacterias son Gram positivas, aerobias facultativos, caracterizadas por sobrevivir en condiciones de estrés ambiental (bajos nutrientes, cambios de pH, cambios de temperatura, poseer resistencia en condiciones de anaerobiosis, etc.) y causantes de infecciones recurrentes debido a sus genes de resistencia y su capacidad de formación de biopelículas complejas. *E. faecalis* es de las principales bacterias encontradas en gran número de fracasos endodóncicos, mientras que *S. aureus* es considerado uno de los principales colonizadores de implantes dentales y se relaciona con el fracaso de estos. Los antibióticos han sido el tratamiento de elección durante muchos años para las infecciones bacterianas, sin embargo, estos han perdido gradualmente su capacidad antibacteriana debido a la aparición de resistencia microbiana derivado su uso indiscriminado y en grandes cantidades, por lo que es necesario encontrar nuevos tratamientos con poca o casi nula resistencia y con un gran espectro antibacteriano, al respecto, la utilización de biopolímeros naturales como el quitosano o del péptido antimicrobiano LL-37, representan una estrategia eficaz para el control del crecimiento de estas cepas de importancia médica-odontológica.

### **4 JUSTIFICACIÓN**

La resistencia a los antibióticos es un problema cada vez mayor al que se enfrentan los sectores de la atención a la salud, incluida la odontología. La creciente aparición de cepas multi-resistentes en las últimas décadas representa una grave amenaza para el control microbiológico y enfatiza la necesidad de aplicar nuevas moléculas antibacterianas para combatir infecciones. Los AMP's como LL-37, muestran una potente eficacia contra una gran cantidad de microorganismos, por lo que se les ha considerado como posibles agentes terapéuticos <sup>85</sup>. Los AMP's son componentes del sistema inmune innato en los

seres vivos, siendo la primera línea de defensa; presentan un amplio rango de patógenos susceptibles (bacterias, hongos y virus) con la ventaja de no inducir resistencia en estos, por lo cual logran actuar en cepas multirresistentes, además de poseer características con las cuales les es posible revertir esta resistencia en ciertas bacterias mediante la destrucción de la membrana externa facilitando el ingreso de fármacos a sus dianas intracelulares. Por otro lado, el quitosano es un biopolímero antibacteriano, biocompatible y biodegradable. Diversos informes demuestran que el quitosano en forma de hidrogel/gel tiene un gran potencial para su uso en aplicaciones farmacéuticas y médicas, esto debido a sus propiedades mucho-adhesivas, de liberación prolongada, formación de película, aceleración de la cicatrización y buena absorción. Este biopolímero es frecuentemente utilizado como vehículo o sistema de administración de fármacos, por lo que su uso en conjunto con LL-37 representa un tratamiento prometedor en odontología, tomando en cuenta las ventajas de estos compuestos.

## **5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Quitosano y el péptido LL-37 tienen efecto antibacteriano sobre las cepas de importancia médico-odontológica: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*?

## **6 HIPÓTESIS**

Quitosano y el péptido LL-37 poseen un efecto antibacteriano sobre las cepas de importancia médico-odontológica: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

## **7 OBJETIVOS**

### **7.1 General.**

Evaluar el efecto antibacteriano de quitosano y el péptido LL-37 sobre dos cepas de importancia médico-odontológica: *S. aureus* y *E. faecalis*.

## **7.2 Específicos.**

1. Evaluar el efecto antibacteriano de quitosano y el péptido LL-37 sobre cepas de *S. aureus* y *E. faecalis* en cultivos en placas de agar mediante antibiogramas.
2. Evaluar el efecto antibacteriano de quitosano y el péptido LL-37 sobre cepas de *S. aureus* y *E. faecalis* en cultivos en caldo mediante espectrofotometría.

## **8 MATERIALES**

### **8.1 Recursos humanos:**

- Tutora y asesor de tesis.
- Tesista estandarizada para el manejo de los equipos de laboratorio y realización de pruebas bacterianas.

### **8.2 Recursos materiales para el cultivo de microorganismos:**

- Cepas bacterianas (*S. aureus* y *E. faecalis*).
- Cámara de incubación Felisa 35 °C.
- Incubadora orbital con control de temperatura.
- Placas de agar HK y cerebro-corazón.
- Asas bacteriológicas.
- Tubos de caldo enriquecidos HK.
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL y 200 µL.
- Puntas de pipetas.
- Tubos Falcon.
- Mechero.

### **8.3 Recursos materiales las pruebas de inhibición bacteriana:**

- Cámara de incubación Felisa 35 °C.
- Cámara de incubación Cleaver 35 °C.
- Espectrofotómetro.
- Lector de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode, Molecular Devices).
- Placa de 96 pozos estériles (Corning™ clear-poliestireno).
- Película elástica Reynolds.
- Microtubos de 1.7 mL
- Placas de agar HK.
- Tubos de caldo enriquecidos HK.

- Tubos Falcon.
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L y 200  $\mu$ L.
- Puntas de pipetas (azules y amarillas).
- Pipetas Pasteur.
- Asas bacteriológicas.
- Mechero.

## 9 DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio de Biointerfases de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

### 9.1 Compuestos evaluados

Se prepararon hidrogeles al 1% y 2%, mezclando quitosano (peso molecular medio, y con un 75-85% de desacetilación; SIGMA Aldrich, USA) en ácido acético al 1%; esta solución fue filtrada por una membrana de 0.22  $\mu$ m y se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 hrs hasta su completa disolución. La solución con el hidrogel se mantuvo a 4°C hasta su empleo experimental. Mientras que el péptido LL-37 fue adquirido en VWR-AnaSpec (No. de catálogo: 103006-556).

La **tabla 1** presenta los compuestos que fueron probados en este estudio, mientras que la **tabla 2** presenta las características de las especies bacterianas que fueron evaluadas.

**Tabla 1.** Compuestos analizados.

Nombre de la proteína/compuesto evaluado	Presentación
Quitosano al 1% y 2%	Hidrogel
LL-37 al 1 y 10 $\mu$ g/ $\mu$ L	Líquida

**Tabla 2.** Cepas de referencia que fueron utilizadas para determinar la efectividad antimicrobiana de los compuestos evaluados:



Espece	ATCC*	Gram	Respiración	Asociación
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	aeróbica	Infecciones oportunistas y asociadas a dispositivos biomédicos.
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	+	facultativa	Infecciones endodóncicas, periimplantitis.

## 9.2 Prueba de actividad antibacteriana en placas de agar (Antibiograma).

Las especies bacterianas empleadas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana provienen de cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). En el caso de *E. faecalis*, esta cepa fue crecida en agar enriquecido cerebro-corazón, suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona (C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, (vitamina K), 5 µg/mL de hemina y 5% de sangre de carnero desfibrinada a 35°C en una cámara de incubación Felisa durante 24 horas.

Por otra parte, *S. aureus* fue cultivada en agar enriquecido TSA (agar soya Tripticasa), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina, en una incubadora a 35°C, durante 24 horas. Cada una de las cepas se propagó y transfirió hasta obtener cultivos puros.

Las pruebas de antibiograma se realizaron como se describe a continuación. De cada cepa en cultivo puro, se recolectó el crecimiento de la superficie del agar y se colocó en tubos con caldo enriquecido cerebro-corazón o TSB, suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina. Posteriormente, se ajustó la densidad óptica (OD por sus siglas en inglés) de cada tubo a 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm para obtener el mismo número de células/mL en cada ensayo. De la solución ajustada a OD = 1 de cada cepa bacteriana, se transfirieron 100 µL a placas de Petri con agar enriquecido, según el tipo de microorganismo y fueron esparcidos de manera homogénea en la superficie de agar, por medio de la técnica de sembrado en pasto. Una vez esparcida la suspensión con los microorganismos, se colocaron cinco discos de papel Whatman; cada

uno de ellos fue embebido con cada uno de los compuestos a evaluar. Además, un disco fue embebido en una solución clorhexidina al 0.2 % (CHX) (Control positivo) y otro disco fue embebido en agua bidestilada estéril (Control negativo).

Las cajas de Petri sembradas con cada una de las cepas y con sus respectivos discos, se incubaron durante 24 horas a 35°C en una cámara de incubación Felisa. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el examen visual de los halos de inhibición presentes en cada una de las cajas de Petri. La medición de cada uno de los halos de inhibición se registró en milímetros (mm) utilizando el analizador de imágenes aColyte 3, Symbiosis.

### **9.3 Prueba de actividad antibacteriana en caldo.**

En placas de 96 pozos estériles (Corning™ clear-poliestireno) se colocaron el quitosano ajustado al 1 y 2% y el péptido LL-37 a una concentración final de 1 y 10 µg/µL adicionados con cada especie bacteriana seleccionada, ajustada a una concentración de  $1 \times 10^6$  células bacterianas (**Tabla 2**), cada ensayo se realizó por triplicado. Como controles positivos (+) se utilizó clorhexidina al 0.20% y como control negativo medio de cultivo líquido con cepa bacteriana. Las placas de 96 pozos se incubaron en aerobiosis en una cámara Cleaver a 35 °C durante 24 horas, en plataforma de agitación a 160 rpm, a las condiciones especificadas previamente. Después de ese período de tiempo las placas se leyeron con el lector de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode, Molecular Devices) a una  $\lambda = 600$  nm.

### **9.4 Análisis estadístico**

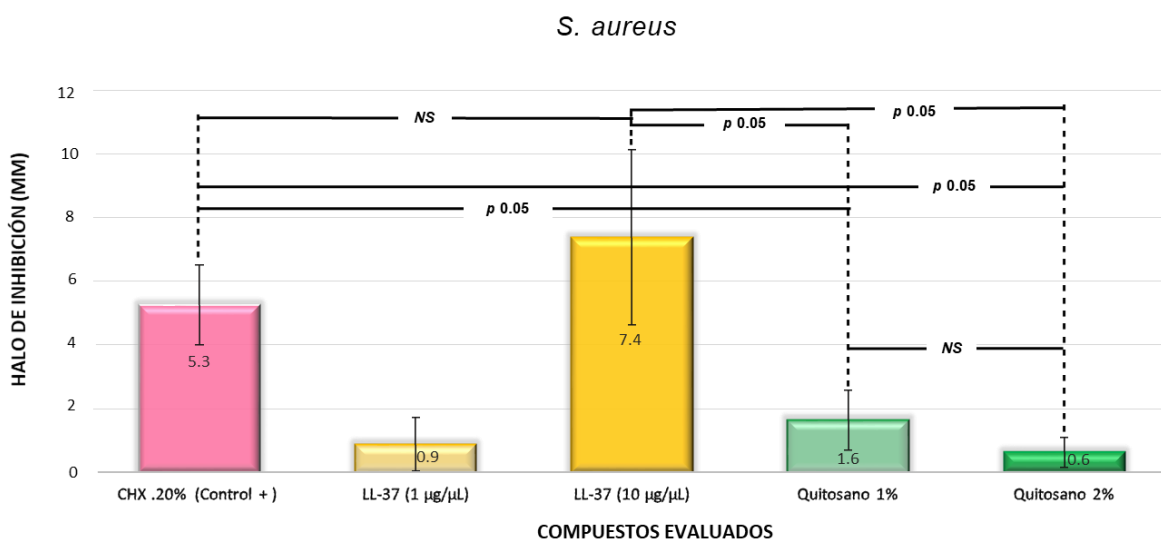
Los resultados se promediaron por triplicado y se compararon en par con respecto al promedio de los controles positivos, por cepa individual, por medio de la prueba estadística paramétrica T de Student, con paquete estadístico SPSS y ajuste de comparaciones múltiples por triplicado, con un intervalo de confianza del 95%. Todos los

datos, tanto de la medición de los halos de inhibición como los valores de OD 600, se capturaron en una base de datos en Excel dónde se graficaron los promedios y el error estándar de la media (EEM) de cada ensayo y se colocaron las significancias obtenidas.

## 10 RESULTADOS

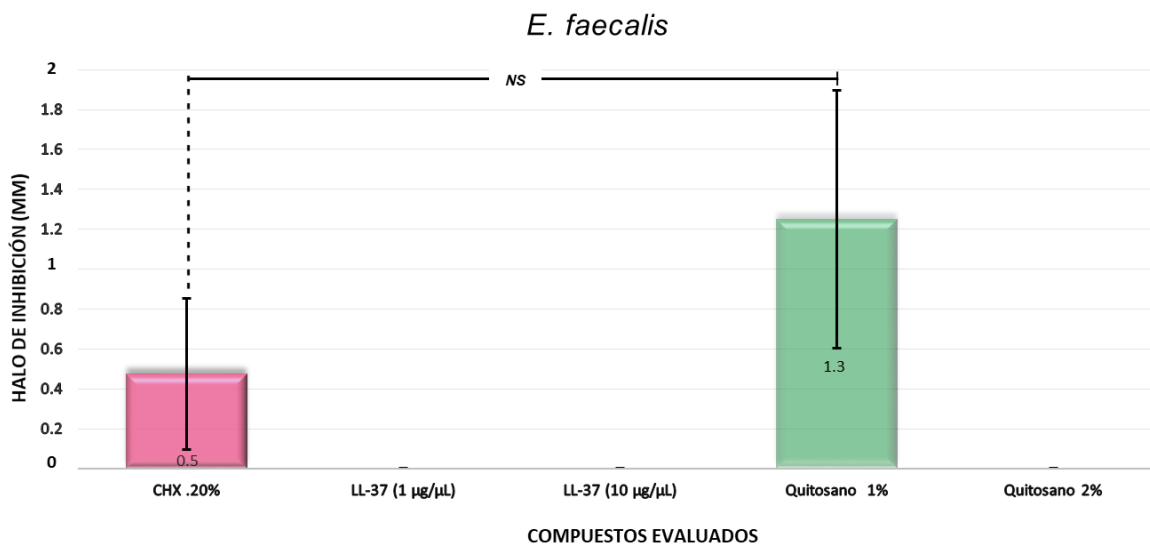
### 10.1 Efecto antibacteriano de quitosano y el péptido LL-37 sobre cepas de *S. aureus* y *E. faecalis* en cultivos en placas de agar (antibiogramas).

A continuación, se presentan los resultados de *S. aureus* y *E. faecalis* obtenidos mediante las pruebas de antibiograma. La **figura 13** muestra los promedios de los halos de inhibición bacteriana en milímetros de cada uno de los compuestos analizados.



**Figura 13.** La gráfica muestra el promedio en milímetros de los halos de inhibición de cada compuesto sobre la cepa *S. aureus*.

Como se puede observar el compuesto que mostró mayor efecto antimicrobiano fue LL-37 a una concentración de 10µg/µL con un halo de inhibición de ±7.4mm (7.4 ± 2.8 mm), seguido de CHX a una concentración de 0.2% (5.3 ± 1.3 mm), sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa entre ambos compuestos evaluados ( $p = NS$ ). También se encontró que LL-37 a una concentración de 1µg/µL mostró una menor inhibición del crecimiento de *S. aureus* (0.9 ± 0.9 mm). Finalmente, quitosano evaluado al 1% y 2% mostró una inhibición microbiana de ±1.6mm (1.6 ± 0.9 mm) y ±0.6mm (0.6 ± 0.5 mm) respectivamente ( $p = NS$ ).

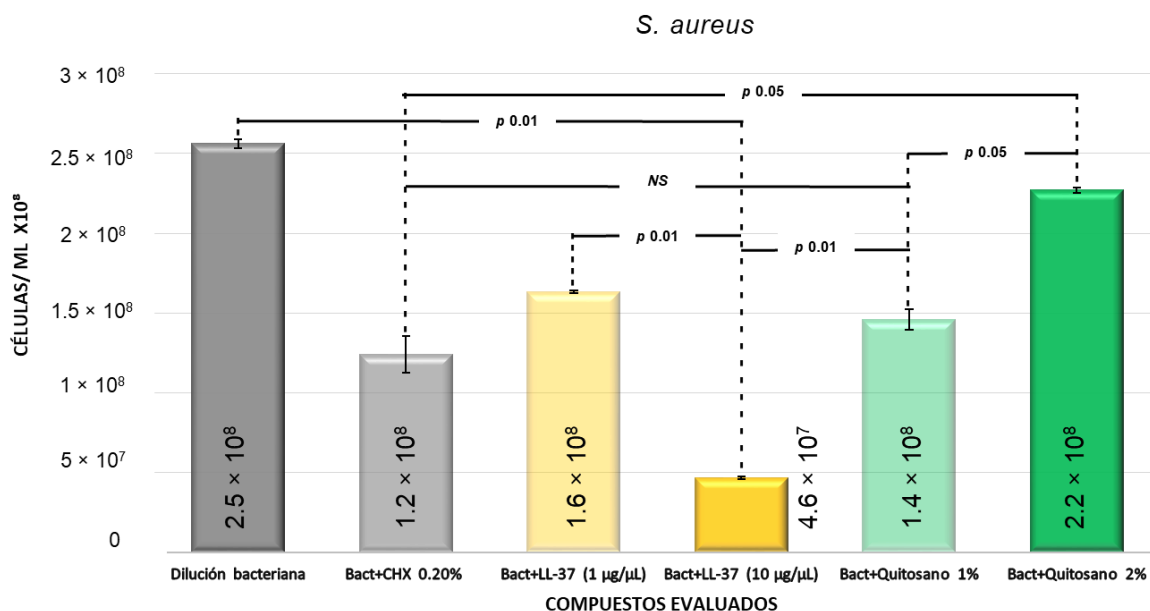


**Figura 14.** La gráfica muestra el promedio en milímetros de los halos de inhibición de cada compuesto sobre la cepa *E. faecalis*.

En la **figura 14** se observa que el compuesto que presentó mayor inhibición contra *E. faecalis* fue quitosano al 1% con un halo de  $\pm 1.3\text{mm}$  ( $1.3 \pm 0.6\text{ mm}$ ), seguido de CHX al 0.2% con un halo de  $\pm 0.5\text{mm}$  ( $0.5 \pm 0.4\text{ mm}$ ), sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos compuestos ( $p = NS$ ). Los grupos experimentales de LL-37 en las concentraciones de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y  $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$  no presentaron efecto antibacteriano, lo mismo sucedió con quitosano al 2%, que no presentó inhibición contra la cepa *E. faecalis*.

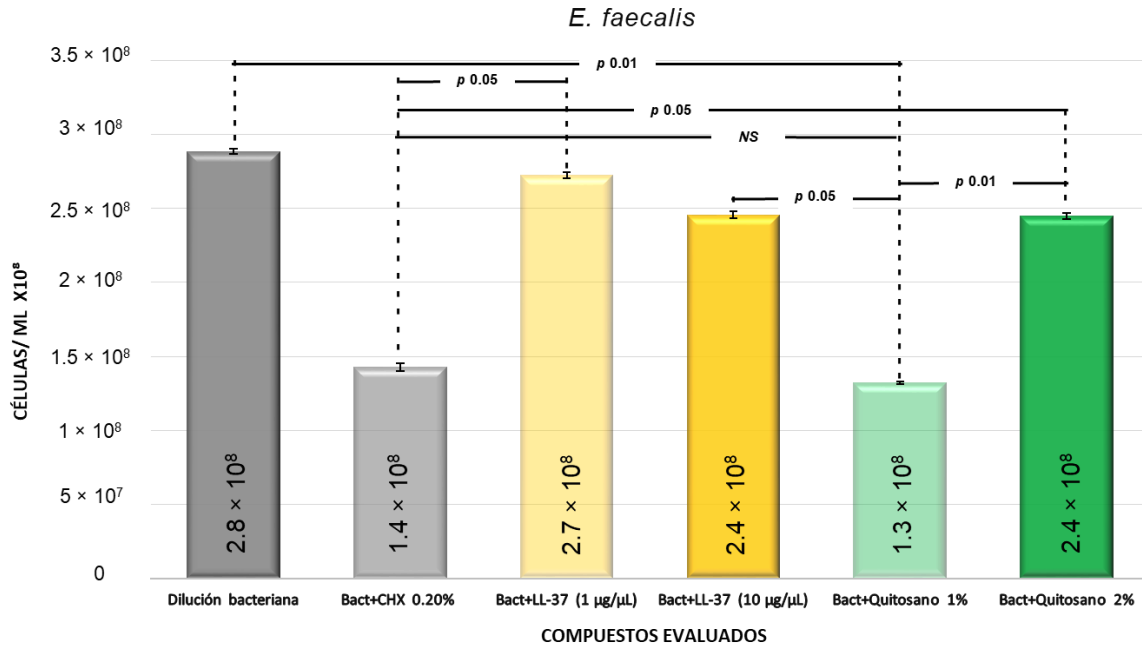
## 10.2 Efecto antibacteriano de quitosano y el péptido LL-37 sobre cepas de *S. aureus* y *E. faecalis* en cultivos en caldo.

A continuación, se observan los resultados derivados de la evaluación del efecto antimicrobiano de los diferentes compuestos evaluados sobre las cepas *S. aureus* y *E. faecalis* en caldo. La **figura 15** el efecto en el crecimiento bacteriano de los diferentes compuestos evaluados sobre la cepa bacteriana *S. aureus*.



**Figura 15.** Crecimiento bacteriano en cada compuesto evaluado. De izquierda a derecha: dilución bacteriana (control negativo); clorhexidina al 0.20% (control positivo); LL-37 a 1 µg/µL y LL-37 a 10 µg/µL; quitosano al 1% y quitosano al 2%.

En la figura anterior se puede observar que todos los compuestos evaluados lograron inhibir el crecimiento bacteriano de la cepa *S. aureus*. El compuesto que mostró mayor efecto antibacteriano fue LL-37 en la concentración de 10 µg/µL, disminuyendo de 2.5×10<sup>8</sup> (valor de la dilución bacteriana) a 4.6×10<sup>7</sup> ( $p < 0.01$ ). Además LL-37 de 10 µg/µL mostró una diferencia estadísticamente significativa con la inhibición bacteriana lograda por LL-37 en la concentración de 1 µg/µL (1.6×10<sup>8</sup>) ( $p < 0.01$ ), y con quitosano al 1% (1.4×10<sup>8</sup>) ( $p < 0.01$ ). Por otro lado, el efecto antibacteriano logrado por el hidrogel quitosano al 2% (2.2×10<sup>8</sup>) presentó diferencias estadísticamente significativas con el quitosano al 1% ( $p < 0.05$ ) y con CHX al 0.20% (1.2×10<sup>8</sup>) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 16.** Crecimiento bacteriano en cada compuesto evaluado. De izquierda a derecha: dilución bacteriana (ajustada una concentración de  $1 \times 10^6$  células), dilución más clorhexidina al 0.20%, dilución más LL-37 a  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , dilución más LL-37 a  $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , dilución más quitosano al 1% y dilución más quitosano al 2%.

Finalmente, en la **figura 16** se observa el efecto en el crecimiento bacteriano de los diferentes compuestos evaluados sobre la cepa bacteriana *E. faecalis*. Como se puede apreciar, el número de células bacterianas disminuyó considerablemente con la CHX al 0.20% ( $1.4 \times 10^8$ ) y con el quitosano al 1% ( $2.7 \times 10^8$ ), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición bacteriana lograda por ambos compuestos ( $p = NS$ ). Podemos notar que la mayor disminución del número de células se dio con quitosano al 1%, de  $2.8 \times 10^8$  (dilución bacteriana) a  $1.3 \times 10^8$ . Por otro lado, LL-37 a  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  redujo el crecimiento bacteriano a  $2.7 \times 10^8$ , mostrando una diferencia estadísticamente significativa con la inhibición observada lograda por CHX 0.20% ( $p < 0.05$ ). La inhibición bacteriana lograda por LL-37 a  $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  fue significativa cuando se comparó con la inhibición del crecimiento bacteriano lograda por quitosano 1% ( $p < 0.05$ ). Finalmente, el hidrogel de quitosano al 1% logró una mayor inhibición del crecimiento bacteriano en comparación con dicho compuesto al 2% ( $2.4 \times 10^8$ ) ( $p < 0.01$ ).

## 11 DISCUSIÓN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto antibacteriano del quitosano y del péptido LL-37 sobre dos cepas de importancia médica-odontológica: *S. aureus* y *E. faecalis*. Para cumplir con este objetivo, se evaluó la inhibición bacteriana de los compuestos de interés (quitosano al 1% y 2%, LL-37 al 1 y 10 µg/µL), sobre las cepas antes mencionadas, todo esto analizado mediante ensayos de antibiograma sobre placas de agar y ensayos de dilución en caldo.

Se evaluaron estos agentes antimicrobianos (LL-37 y quitosano) con el objetivo de estudiar su posible comportamiento frente a las cepas bacterianas seleccionadas. Es importante mencionar que los dos compuestos evaluados presentan un mecanismo de acción muy similar contra bacterias, siendo de naturaleza catiónica, lo que quiere decir que actúan sobre las membranas bacterianas, debido a la superficie aniónica de dichas membranas, induciendo la formación de poros.

LL-37 es un péptido que presenta un amplio espectro de acción que incluye no solo a bacterias, sino también a hongos y virus, se menciona que su cualidad antimicrobiana se debe a su carga neta positiva. Algunos estudios demuestran que evita la formación de biopelículas e incluso puede interrumpir biopelículas maduras de 24 hasta 48 horas, de bacterias como *S. aureus*<sup>86</sup>. Sin embargo, se menciona que LL-37 ha presentado algunas desventajas para su uso clínico, como lo son, su débil estabilidad en algunos medios biológicos, presenta digestión proteolítica en diferentes fluidos corporales, interacciones pobres con macromoléculas del huésped, toxicidad potencial y un elevado costo, lo que puede interferir con sus potenciales usos en odontología<sup>87, 88</sup>

Por otro lado tenemos al quitosano, un biopolímero obtenido de los crustáceos y de fácil producción. Este biopolímero presenta múltiples usos debido a sus excelentes características fisicoquímicas. Ha sido empleado en distintos campos, como el tratamiento de aguas residuales, alimentos y bebidas, cosméticos, agroquímicos, cultivo celular, textiles



y dispositivos médicos <sup>89</sup>. En el área de la medicina se utiliza para la fabricación de suturas biodegradables, membranas, sustituyente artificial de piel, agente cicatrizante, liberador de fármacos, transporte de agentes anticancerígenos, por mencionar algunos <sup>90</sup>. Múltiples estudios mencionan que el quitosano en forma de hidrogeles tiene un gran potencial en aplicaciones farmacéuticas y médicas <sup>91, 92</sup>. Las características favorables del quitosano hacen posible incorporarlo en la fabricación de distintos materiales en odontología, donde es utilizado en implantología, endodoncia, odontología restauradora, para la remineralización de los tejidos dentarios y para mejorar las propiedades mecánicas de la dentina. Además, se ha utilizado para el tratamiento de la periodontitis, incluida en la regeneración ósea y para la administración de fármacos <sup>93</sup>. Diversos artículos mencionan la capacidad antibacteriana del quitosano contra microorganismos planctónicos, y aunque existe poca información relacionada contra su efecto sobre la adhesión bacteriana, el quitosano ha mostrado un fuerte efecto inhibitorio en la formación de biopelículas de algunos de los principales patógenos periodontales, conservando su actividad antimicrobiana hasta después de 168 horas, y contra biopelículas de co-cultivos, lo que indica que interfiere en la coagregación bacteriana <sup>94</sup>.

Con respecto a los resultados obtenidos mediante la prueba de antibiograma en cepas de *S. aureus*, vimos que esta bacteria fue mucho más sensible a LL-37, pero únicamente al aumentar la concentración a 10 µg/µL, presentando incluso mejor efecto que CHX al 0.20%. Este efecto inhibitorio de LL-37 coincide con lo reportado previamente por Pavelka y cols. quienes mostraron que *S. aureus* es sensible a LL 37 a partir de una concentración de 0.5 µg/µL <sup>95</sup>. Además, LL-37 *in vitro* ha reportado tener un gran efecto antibacterial contra esta *S. aureus*, previniendo y evitando la formación de biopelículas <sup>96</sup>. <sup>97</sup>. En cuanto a los resultados de quitosano se puede ver que a pesar de tener efecto antibacteriano, sobre todo en la concentración de 1%, este no fue significativo, lo que puede deberse a la colocación del hidrogel de quitosano en el antibiograma, ya que este no

difundió en los discos de papel de la misma manera que los compuestos completamente líquidos, además la literatura reporta que el efecto antibacteriano de quitosano puede verse influenciado por su grado de desacetilación, su peso molecular y otras modificaciones <sup>98</sup>, por lo que estos resultados no son del todo concluyentes, debido a que otros autores han reportado que el quitosano presenta buenos resultados inhibitorios contra *S. aureus* <sup>99</sup> siendo capaz de inhibir el crecimiento planctónico, inhibir la formación de biopelículas, reducir la viabilidad bacteriana e interrumpir biopelículas ya establecidas de *S. aureus* <sup>100</sup>.

Al analizar los resultados de los antibiogramas de *E. faecalis*, notamos que, además de quitosano al 1 % y CHX al 0.20% (usada como control positivo), ningún otro compuesto presentó efecto antibacteriano. En cuanto a la nula inhibición del péptido LL-37 contra esta bacteria, Zhang y cols. han mencionado que *E. faecalis* parece ser resistente al efecto de LL-37 y otros péptidos antimicrobianos <sup>101</sup> y esta resistencia puede deberse a diversas razones. Se especula que algunas proteínas asociadas a la superficie de *E. faecalis*, desconocidas, pudieran dificultar el acceso de los péptidos a la membranas citoplasmática. También se ha informado que la gelatinasa de *E. faecalis* puede escindir a LL-37 <sup>102</sup>. Sin embargo, quitosano al 1% logró obtener una respuesta positiva inhibiendo a *E. faecalis*, presentando buenos resultados en distintos estudios. Aunque de igual manera, la efectividad antibacteriana de este compuesto contra *E. faecalis* se ve modificada dependiendo del peso molecular y de otras características como su concentración <sup>98</sup>, siendo en este estudio más efectiva la concentración de quitosano al 1%.

Con respecto a los ensayos de dilución bacteriana de *S. aureus* en caldo, confirmamos lo presentado en los resultados de los antibiogramas, observando que el compuesto con menor crecimiento bacteriano fue LL-37 en concentración de 10 µg/µL con una reducción bastante significativa del número de células bacterianas, seguido por CHX al 0.20% y quitosano al 1%. Por lo tanto, LL-37 ha demostrado un buen efecto antibacteriano *contra S. aureus*, coincidiendo con diversos artículos <sup>96, 103</sup>.

En los resultados de crecimiento bacteriano en diluciones de *E. faecalis*, podemos observar que el compuesto con menor crecimiento bacteriano fue quitosano al 1% ( $1.3 \times 10^8$ ), bastante similar al resultado de CHX al 0.20% ( $1.4 \times 10^8$ ), lo cual confirma su efecto inhibitorio contra esta cepa. Por otro lado, notamos que los demás compuestos en este experimento, sí presentaron efecto antimicrobiano, lo que puede deberse a que en las diluciones en caldo las moléculas interactúan de mejor manera con las células; aunque esta inhibición presentada sigue siendo mínima y no es comparable con la observada en quitosano al 1%.

## 12 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que tanto *S. aureus* como *E. faecalis* son cepas bacterianas con alta resistencia a antimicrobianos, asociadas a diversas enfermedades de la cavidad oral, por lo que es importante encontrar nuevas alternativas de tratamiento. El presente trabajo permitió estudiar el comportamiento de dos compuestos antimicrobianos (quitosano y LL-37) a distintas concentraciones y observar su efecto en las cepas bacterianas antes mencionadas.

De acuerdo al presente proyecto, los compuestos con mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de *S. aureus* fueron LL-37 y seguido por quitosano al 1%, confirmado por las pruebas de antibiograma y dilución en caldo. Mientras que la cepa de *E. faecalis* fue más resistente a los antimicrobianos, siendo el compuesto de quitosano el único que mostró efecto antibacteriano, después de CHX (control positivo), cuando se evaluó en dilución bacteriana en caldo, se confirmó el hallazgo obtenido en los antibiogramas.

LL-37 es un péptido que ha presentado buenos resultados antibacterianos reportados en la literatura, sin embargo por su alto costo, no nos es posible realizar una gran cantidad de ensayos para probar su efecto. En contraparte, quitosano, que es un biopolímero de fácil obtención, menor costo y buena respuesta inhibitoria, se podría considerar como una mejor opción para continuar estudiando sus propiedades y su uso en odontología.

Con respecto a los antibiogramas realizados, es importante mencionar que la difusión de los compuestos en los discos de papel, generó variabilidad en los halos de inhibición, esto debido al uso de formas semilíquidas como lo son los hidrogeles de quitosano; además de que la inoculación de los microorganismos en las placas Petri no fue totalmente uniforme en ciertas zonas por lo que la lectura de los halos de inhibición fue menos precisa en algunos casos. Sin embargo, el estudio de dilución bacteriana en caldo analizado mediante espectrofotometría, nos permitió comparar y confirmar los resultados

ya obtenidos. Las variaciones en los resultados nos permiten apreciar la curva de aprendizaje obtenida del presente proyecto.

La resistencia antimicrobiana de *E. faecalis* observada en el presente estudio, nos incentiva a seguir estudiando los mecanismos de virulencia de esta cepa para conocer las razones de su comportamiento frente a los distintos compuestos evaluados

### 13 BIBLIOGRAFÍA

1. The Human Oral Microbiome Database [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.homd.org>.
2. Cruz Quintana SM, Díaz Sjöstrom P, Arias Socarrás D, Mazón Baldeón GM. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología*. 2017;54(1):84-99.
3. Colombo A, Tanner A. The role of bacterial biofilms in dental caries and periodontal and peri-implant diseases: a historical perspective. *Journal of Dental Research*. 2019;98(4):373-85.
4. Luo Y, Yang Q, Zhang D, Yan W. Mechanisms and control strategies of antibiotic resistance in pathological biofilms. 2021.
5. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32:7-15.
6. Socransky S, Haffajee A, Dzink J. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *Journal of clinical periodontology*. 1988;15(7):440-444.
7. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Acinetobacter* in human periodontitis. *Oral microbiology and immunology*. 1990;5(3):149-54.
8. Kouidhi B, Zmantar T, Hentati H, Bakhrouf A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. *Microbial pathogenesis*. 2010;49(1-2):14-22.
9. Rivas MA, Yulany S, Daboïn I, Díaz C, Salas E, Urdaneta LE. Frecuencia de aislamiento y susceptibilidad de *Enterococcus faecalis* en pacientes endodónticos. *odontologia*. 2012;7:1.

10. Goy RC, Britto Dd, Assis OB. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*. 2009;19:241-7.
11. da Silva FP, Machado MCC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012;36(2):308-14.
12. Izadi N, Keikha M, Ghazvini K, Karbalaei M. Oral antimicrobial peptides and new therapeutic strategies for plaque-mediated diseases. *Gene Reports*. 2020;21:100811.
13. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*. 2006;42(1):80-7.
14. Corralo DJ, Ev LD, Damé-Teixeira N, Maltz M, Arthur RA, Do T, et al. Functionally Active Microbiome in Supragingival Biofilms in Health and Caries. *Caries Research*. 2021;55(6):603-16.
15. Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular microbiology*. 2001;39(2):223-35.
16. Iliadis I, Daskalopoulou A, Simões M, Giaouris E. Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm formation by *Salmonella enterica ser. Enteritidis* and *Typhimurium* under low nutrient food-related conditions. *Food Research International*. 2018;107:10-8.
17. Moraes RM, Schlagenhaut U, Anbinder AL. Outside the limits of bacterial viability: postbiotics in the management of periodontitis. *Biochemical Pharmacology*. 2022:115072.
18. Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. Periodontal disease: The good, the bad, and the unknown. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021:1210.
19. Tokajuk J, Deptuła P, Piktel E, Daniluk T, Chmielewska S, Wollny T, et al. Cathelicidin LL-37 in health and diseases of the oral cavity. *Biomedicines*. 2022;10(5):1086.

20. Mobili-Rocaró D, Falcón D, Rodríguez M. *Staphylococcus spp.* en bolsas periodontales de un grupo de pacientes que acuden a un Centro Odontológico del Municipio San Diego, Estado Carabobo. *Kasmera*. 2017;45(1):16-23.
21. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *Journal of endodontics*. 2006;32(3):173-7.
22. Souto R, Colombo APV. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Archives of oral biology*. 2008;53(2):155-60.
23. Pasachova Garzón J, Ramírez Martínez S, Muñoz Molina L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*. 2019;17(32):25-38.
24. Lomelí-Marroquín D, Cruz DM, Nieto-Argüello A, Crua AV, Chen J, Torres-Castro A, et al. Starch-mediated synthesis of mono-and bimetallic silver/gold nanoparticles as antimicrobial and anticancer agents. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:2171.
25. Zhao Y, Qu Y, Tang J, Chen J, Liu J. Tea Catechin Inhibits Biofilm Formation of Methicillin-Resistant *S. aureus*. *Journal of Food Quality*. 2021;2021:1-7.
26. Tolera M, Abate D, Dheresa M, Marami D. Bacterial nosocomial infections and antimicrobial susceptibility pattern among patients admitted at Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia. *Advances in medicine*. 2018;2018.
27. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(12):751-62.
28. Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MF, Boelens HA, Hofman A, Van Belkum A, et al. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a “culture rule”. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(6):806-11.



29. Armstrong-Esther C, Smith J. Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Annals of human biology*. 1976;3(3):221-7.
30. Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, De Silva G, Kantzanou M, Crook D, et al. Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(12):5718-25.
31. Bitterman Y, Laor A, Itzhaki S, Weber G. Characterization of the best anatomical sites in screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2010;29(4):391-7.
32. Colombo APV, Magalhães CB, Hartenbach FARR, do Souto RM, da Silva-Boghossian CM. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbial pathogenesis*. 2016;94:27-34.
33. Kim G-Y, Lee CH. Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. *Journal of Periodontal & Implant Science*. 2015;45(6):223-8.
34. McCormack M, Smith A, Akram A, Jackson M, Robertson D, Edwards G. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? *American journal of infection control*. 2015;43(1):35-7.
35. Garbacz K, Kwapisz E, Wierzbowska M. Denture stomatitis associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: a case report. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):1-4.
36. Muñoz LC, Pinilla G, Navarrete J. Biopelícula en *Staphylococcus spp.*: estructura, genética y control. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2019;37(1):18-29.
37. Zapotoczna M, O'Neill E, O'Gara JP. Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS pathogens*. 2016;12(7).
38. Ondusko DS, Nolt D. *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics in review*. 2018;39(6):287-298.

39. Uribe-García A, Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Bustos-Martínez J, Hamdan-Partida A, Garzón J, et al. Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2021;54(2):267-75.
40. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 2014;61(1):28-40.
41. Abdolmaleki Z, Mashak Z, Safarpour Dehkordi F. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital cockroaches. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019;8(1):1-14.
42. Khamisi N, Fathi A, Yari A. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from dental plaques. *Academic Journal of Health Sciences: Medicina balear*. 2022;37(1):136-40.
43. López-Cerero L. Infecciones relacionadas con los implantes dentarios. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008;26(9):589-92.
44. Kim JY, Song HS, Kim YB, Kwon J, Choi J-S, Cho Y-J, et al. Genome sequence of a commensal bacterium, *Enterococcus faecalis* CBA7120, isolated from a Korean fecal sample. *Gut Pathogens*. 2016;8(1):1-8.
45. Zhou X, Li Y. Subgingival microbes. *Atlas of oral microbiology*. 2015:67-93.
46. Gilmore MS, Lebreton F, Van Schaik W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current opinion in microbiology*. 2013;16(1):10-6.
47. Lebreton F, Willems RJ, Gilmore MS. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]*. 2014.

48. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *Journal of Infectious Diseases*. 1990;162(1):82-90.
49. Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*. 2013;5(5):895-911.
50. Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers in microbiology*. 2016;6:1534.
51. Zheng J-X, Wu Y, Lin Z-W, Pu Z-Y, Yao W-M, Chen Z, et al. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2338.
52. Waar K. Pathogenesis of nosocomial infections with *Enterococcus faecalis*: University Library Groningen][Host]; 2004.
53. Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, et al. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity*. 2006;74(7):4164-71.
54. Díaz Pérez M, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2010;48(2):147-61.
55. Athanassiadis B, Abbott P, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian dental journal*. 2007;52:S64-S82.
56. Testing ECoAS. EUCAST expert rules version 3.1. intrinsic resistance and exceptional phenotypes tables. 2016.
57. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*. 2012;3(5):421-569.

58. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004;15(5):308-20.
59. Saffari F, Dalfardi MS, Mansouri S, Ahmadrajabi R. Survey for correlation between biofilm formation and virulence determinants in a collection of pathogenic and fecal *Enterococcus faecalis* isolates. *Infection & chemotherapy*. 2017;49(3):176-83.
60. Kim H-S, Woo Chang S, Baek S-H, Han SH, Lee Y, Zhu Q, et al. Antimicrobial effect of alexidine and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* infection. *International journal of oral science*. 2013;5(1):26-31.
61. Fahimirad S, Ghaznavi-Rad E, Abtahi H, Sarlak N. Antimicrobial activity, stability and wound healing performances of chitosan nanoparticles loaded recombinant LL37 antimicrobial peptide. *International journal of peptide research and therapeutics*. 2021;27(4):2505-15.
62. Ezeoha S, Ezenwanne J. Production of biodegradable plastic packaging film from cassava starch. *IOSR Journal of Engineering*. 2013;3(10):14-20.
63. Baranwal J, Barse B, Fais A, Delogu GL, Kumar A. Biopolymer: A sustainable material for food and medical applications. *Polymers*. 2022;14(5):983.
64. Pan Y, Farmahini-Farahani M, O'Hearn P, Xiao H, Ocampo H. An overview of bio-based polymers for packaging materials. *J Bioresour Bioprod*. 2016;1(3):106-13.
65. Yaghobi N, Hormozi F. Multistage deacetylation of chitin: Kinetics study. *Carbohydrate Polymers*. 2010;81(4):892-6.
66. Ramawat KG, Mérillon J-M. *Polysaccharides: bioactivity and biotechnology*: Springer; 2015.
67. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*. 2006;31(7):603-32.

68. Patrulea V, Ostafe V, Borchard G, Jordan O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;97:417-26.
69. Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate polymers*. 2017;164:268-83.
70. Chang S-H, Lin H-TV, Wu G-J, Tsai GJ. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydrate polymers*. 2015;134:74-81.
71. Lo W-H, Deng F-S, Chang C-J, Lin C-H. Synergistic antifungal activity of chitosan with fluconazole against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and fluconazole-resistant strains. *Molecules*. 2020;25(21):5114.
72. Charway GN, Park S, Yu D, Je J-Y, Kim D-H, Jung W-K, et al. *In vitro* antibacterial and synergistic effect of chitosan-phytochemical conjugates against antibiotic resistant fish pathogenic bacteria. *Indian journal of microbiology*. 2019;59(1):116-20.
73. Türkoğlu O, Emingil G, Kütükçüler N, Atilla G. Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2009;80(6):969-76.
74. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra P, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral microbiology and immunology*. 2008;23(4):328-35.
75. Center UoNM. Antimicrobial Peptide Database 2023. Disponible en: <https://aps.unmc.edu/home>.
76. Olascoaga-Del Angel KS, Sánchez-Evangelista G, Carmona-Navarrete I, del Carmen Galicia-Sánchez M, Gómez-Luna A, Islas-Arrollo SJ, et al. Péptidos

antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Gaceta médica de México. 2018;154(6):681-8.

77. Shah P, Hsiao FSH, Ho YH, Chen CS. The proteome targets of intracellular targeting antimicrobial peptides. Proteomics. 2016;16(8):1225-37.

78. Dürr UH, Sudheendra U, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2006;1758(9):1408-25.

79. Radic M, Muller S. LL-37, a Multi-Faceted Amphipathic Peptide Involved in NETosis. Cells. 2022;11(15):2463.

80. Li L, Peng Y, Yuan Q, Sun J, Zhuang A, Bi X. Cathelicidin LL37 promotes osteogenic differentiation *in vitro* and bone regeneration *in vivo*. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2021;9:638494.

81. Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, Wątek M, Wollny T, Gluszek K, et al. The role of cathelicidin LL-37 in cancer development. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2016;64(1):33-46.

82. Murakami M, Ohtake T, Dorschner R, Gallo R. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. Journal of dental research. 2002;81(12):845-850.

83. Li Y-H, Huang X, Tian X-L. Recent advances in dental biofilm: impacts of microbial interactions on the biofilm ecology and pathogenesis. AIMS Bioengineering. 2017;4(3):335-350.

84. McCrudden MT, O'Donnell K, Irwin CR, Lundy FT. Effects of LL-37 on gingival fibroblasts: a role in periodontal tissue remodeling? Vaccines. 2018;6(3):44.

85. Rivas L, Andreu D. Péptidos antibióticos eucarióticos: ¿ una nueva alternativa en clínica? Enfermedades infecciosas y microbiología clinica. 2003;21(7):358-65.

86. Mohamed MF, Abdelkhalek A, Seleem MN. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. Scientific reports. 2016;6(1):29707.
87. Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? International journal of antimicrobial agents. 2011;38(3):217-25.
88. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Current opinion in pharmacology. 2006;6(5):468-72.
89. Williams PA. Renewable resources for functional polymers and biomaterials: Polysaccharides, proteins and polyesters: Royal society of chemistry; 2011.
90. Naskar S, Sharma S, Kuotsu K. Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2019;49:66-81.
91. Cong Z, Shi Y, Wang Y, Wang Y, Chen N, Xue H. A novel controlled drug delivery system based on alginate hydrogel/chitosan micelle composites. International journal of biological macromolecules. 2018;107:855-64.
92. Frade ML, De Annunzio SR, Calixto GMF, Victorelli FD, Chorilli M, Fontana CR. Assessment of chitosan-based hydrogel and photodynamic inactivation against *Propionibacterium acnes*. Molecules. 2018;23(2):473.
93. Zhang C, Hui D, Du C, Sun H, Peng W, Pu X, et al. Preparation and application of chitosan biomaterials in dentistry. International Journal of Biological Macromolecules. 2021;167:1198-210.
94. Costa EM, Silva S, Pina C, Tavaría FK, Pintado M. Antimicrobial effect of chitosan against periodontal pathogens biofilms. SOJ Microbiology & Infectious Diseases. 2014;2(1):1-6.

95. Pavelka A, Vacek L, Norek A, Kobzová Š, Janda L. Recombinant production of human antimicrobial peptide LL-37 and its secondary structure. *Biologia*. 2023;1-11.
96. Kang J, Dietz MJ, Li B. Antimicrobial peptide LL-37 is bactericidal against *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS One*. 2019;14(6).
97. Wei J, Cao X, Qian J, Liu Z, Wang X, Su Q, et al. Evaluation of antimicrobial peptide LL-37 for treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium plate. *Medicine*. 2021;100(44).
98. Supotngarmkul A, Panichuttra A, Ratisoontorn C, Nawachinda M, Matangkasombut O. Antibacterial property of chitosan against *E. faecalis* standard strain and clinical isolates. *Dental Materials Journal*. 2020;39(3):456-63.
99. Costa E, Silva S, Tavarina F, Pintado M. Insights into chitosan antibiofilm activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of applied microbiology*. 2017;122(6):1547-57.
100. Felipe V, Bresler ML, Bohl LP, da Silva ER, Morgante CA, Correa SG, et al. Chitosan disrupts biofilm formation and promotes biofilm eradication in *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;126:60-7.
101. Zhang H, Zhang X, Liang S, Wang J, Zhu Y, Zhang W, et al. Bactericidal synergism between phage endolysin Ply2660 and cathelicidin LL-37 against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* biofilms. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2023;9(1):16.
102. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Molecular microbiology*. 2002;46(1):157-68.
103. Ridyard KE, Overhage J. The potential of human peptide LL-37 as an antimicrobial and anti-biofilm agent. *Antibiotics*. 2021;10(6):650.