



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL EFECTO MICROBIOLÓGICO DEL COMPUESTO DIALIL
DISULFURO SOBRE BIOPELÍCULA BACTERIANA *IN SITU* POR
MICROSCOPIA CONFOCAL**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (ODONTOLÓGICAS)**

PRESENTA:

C.D. UZIEL ISAÍ ARROYO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. VÍCTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. RUTH RINCÓN HEREDIA
INSTITUTO FISIOLÓGICA CELULAR, UNAM

DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX; 11 DE ENERO DEL 2024



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.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	03
SUMMARY.....	04
1. INTRODUCCIÓN.....	05
ANTECEDENTES.....	05
BIOPELÍCULAS BACTERIANAS EN SALUD E INFECCIÓN.....	07
ETAPAS EN EL PROCESO DE CONFIGURACIÓN DE BIOPELÍCULAS.....	11
REGULACIÓN DEL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA.....	13
BIOPELÍCULA EN CAVIDAD BUCAL.....	15
COLONIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS EN CAVIDAD BUCAL...	20
ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA BIOPELÍCULA DENTAL.....	22
BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.....	23
CONSTRUYENDO UNA BIOPELÍCULA. MODELOS <i>IN VITRO</i> DE BIOPELÍCULA DENTAL.....	25
FITOTERAPIA.....	27
CARACTERÍSTICAS DE LA FITOTERAPIA.....	29
SEGURIDAD.....	32
ALLIUM SATIVUM – DIALIL DISULFURO.....	33
ACEITES ESENCIALES.....	39
MICROSCOPIA CONFOCAL.....	40
JUSTIFICACIÓN.....	42
OBJETIVO GENERAL.....	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
HIPÓTESIS.....	43
2. MÉTODOS.....	44
DISPOSITIVO REMOVIBLE.....	44
DISCOS DE HIDROXIAPATITA Y CONCENTRACIÓN DIALIL DISULFURO.....	47
ANÁLISIS VIABILIDAD CELULAR LIVE&DEAD.....	48
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
PROTOCOLO PREPARACIÓN DE SUPERFICIES.....	50
3. RESULTADOS	52
ANÁLISIS DE LA BIOPELÍCULA POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	52
4. DISCUSIÓN.....	66
5. CONCLUSIONES.....	74
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos al Dr. Victor Irahuen García Pérez, por darme las herramientas adecuadas para efectuar el siguiente trabajo de investigación, proporcionarme los conocimientos, así como el apoyo para conformar la escritura y el desarrollo de esta tesis.

A la Dra Ruth Heredia Rincón por permitirme trabajar bajo su apoyo y tutela en el laboratorio de microscopía confocal.

A los miembros del jurado por permitirme desempeñar la defensa y evaluación de mi exámen profesional

A los apoyo recibidos durante mi estancia en el programa de maestría y doctorado en ciencias médicas, odontológicas y de la salud por parte del CONACYT, así como del programa PAPIIT-IN229223.

A mis padres por brindarme su apoyo incondicional en el transcurso y la progresión de mi crecimiento académico y profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual me ha permitido pertenecer desde mi formación en mi estancia de licenciatura y evolucionar actualmente para la obtención de mi título de posgrado

SUMMARY

Bacteria are found associated in nature in two forms: planktonic bacteria and those associated with a biofilm. The bacterial biofilm is created when planktonic bacteria recognize a surface, adhere and produce signaling and recognition mechanisms to carry out the formation of a protective exopolysaccharide structure, which represents a survival strategy against antimicrobial therapy and the immune system, resulting in associations with systemic and oral polymicrobial diseases such as dental caries and periodontal disease.

The objective of our research project is to carry out an evaluation of the antimicrobial activity of the diallyl disulfide compound acting on a mature bacterial biofilm grown in situ on hydroxyapatite surfaces in a period of 48 hours.

The evaluation of the morphological changes of the biofilm grown in situ was carried out through a live&dead cell viability analysis after the interaction of the hydroxyapatite discs with the diallyl disulfide solutions and essential oils. Three hydroxyapatite surfaces were used per individual for a period of no less than 48 hours for their growth and maturation in the oral cavity. This was carried out on 10 volunteers, who had to meet specific inclusion criteria for their selection. The results obtained during the experimental protocol shown in sample channels of viability and lethality evaluated by Arbitrary Intensity Unit (IU) in the confocal microscope, showed total average lethality, control 13.21 ± 1.44 IU; DDS 17.74 ± 2.36 IU; EO 20.61 ± 3.53 IU; viability, control 25.80 ± 2.36 IU; DDS 23.68 ± 4.73 IU; EO 16.90 ± 4.45 IU. The micrographs showed a decrease in viable cells in the DDS and EO groups, as well as an increase in dead cells in the DDS and EO groups. In this study, a reduction in the viability of the biofilm structure was observed in the diallyl disulfide group, distant from the effect of the essential oil-based compound and similar to the control. Regarding the antibacterial effect, this was moderate for the diallyl disulfide compared to the control and with an effect close to cell death to that of the essential oil compound.

I. INTRODUCCIÓN

A. ANTECEDENTES

En los países desarrollados se tiene en cuenta que las principales causas de mortalidad son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer en sus múltiples modalidades. Pese a lo cual, existen datos en Europa que resultan convincentes; las enfermedades infecciosas representan la segunda causa de mortalidad (14.9 millones de muertes), después de las enfermedades cardiovasculares (16.9 millones de muertes) duplicando las muertes por cáncer (7.1 millones de muertes) (datos del World Health Organization, WHO, 2019). Los agentes infecciosos responsables de mortalidad en el hombre han ido evolucionando. En el tiempo actual las enfermedades infecciosas agudas causadas por bacterias patógenas especializadas como la tosferina, peste, cólera, difteria o tétanos, que significaban la principal causa de muerte a principios del siglo XX, han sido controladas gracias a la acción de los antibióticos y de las vacunas. Debido a esto, más de la mitad de las infecciones que infringen daño a los pacientes ligeramente inmunocomprometidos son producidas por bacterias relacionadas con biopelículas, las cuales tienen la capacidad de generar infecciones crónicas, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos. Ejemplos de estas infecciones son la otitis media, endocarditis de válvulas nativas, infecciones urinarias crónicas, infecciones de próstata, osteomielitis y todas las infecciones relacionadas con implantes. El análisis directo de los implantes y tejidos de estas infecciones presentan evidentemente que en la mayoría de los casos la bacteria responsable de la infección prolifera adherida sobre el tejido o el implante, desarrollando comunidades de bacterias a las que se les ha denominado biopelículas. Dentro de estas asociaciones, las bacterias se encuentran protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos mediante antimicrobianos.⁶⁰

Las bacterias existen en la naturaleza mediante dos formas o estados: a) Bacterias planctónicas de libre flotación, b) Bacterias asociadas a biopelículas en colonias de microorganismos sésiles. Desde los tiempos de Robert Koch, bacteriólogos y clínicos se han concentrado al estudio de microorganismos planctónicos, libremente

suspendidos, y descritos con base en sus rasgos distintivos de desarrollo en medios de cultivo adecuados.

Solamente una limitada fracción de las bacterias se presentan en forma planctónica o de libre flotación, y las bacterias en biopelícula son diferentes a las planctónicas. Se ha determinado que el 99% de todas las células bacterianas existen asociadas a biopelículas (biofilm), y solamente el 1% vive en estado planctónico.¹

La capacidad de formación de la biopelícula no parece estar limitada a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas.

Aun cuando la composición de las biopelículas es inconstante en función al sistema de estudio, en general, el principal componente de estas es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de las biopelículas es un complejo elaborado principalmente por exopolisacáridos. En cantidad limitada se localizan otras macromoléculas como DNA, proteínas y diferentes productos procedentes de la lisis de las bacterias.

En los trabajos iniciales sobre la estructura de la biopelícula, una de las cuestiones que emergía con mayor reiteración era como las bacterias del interior podían tener acceso a los nutrientes o al oxígeno. Mediante estudios realizados empleando microscopía confocal se ha identificado que la arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas mas profundas de su estructura. La presencia de estos canales no evita, que dentro de la biopelícula puedan existir ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es distinta. Esta circunstancia incrementa la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se presentan las bacterias dentro de la biopelícula y dificulta su análisis y estudio.⁶³

BIOPELÍCULAS BACTERIANAS EN SALUD E INFECCIÓN

Aún cuando normalmente se relacionan con procesos infecciosos, es importante mencionar que algunas biopelículas mantienen un papel protector. Así, las biopelículas de lactobacilos las cuales se encuentran en la vagina fermentan el glucógeno el cual se induce mediante las células epiteliales al ser estimuladas por los estrógenos, elaborando ácidos que disminuyen el pH vaginal y evita, de esa manera, la colonización por microorganismos patógenos. La eliminación de esta biopelícula con la posterior superposición del pH suele venir acompañada del desarrollo y cambios morfológicos en microorganismos patógenos como *Gardnerella vaginalis* y otros anaerobios asociados.⁵⁸

Un ejemplo rutinario de biopelículas lo integra la placa dentobacteriana. De manera ordinaria se debe eliminar la película de bacterias que recubre la superficie de los dientes para evitar el desarrollo excesivo de microorganismos que pueden provocar un daño permanente del esmalte. Las biopelículas bacterianas representan un antiguo método de sobrevivencia procariótica. Esto se debe a que las bacterias logran beneficios significativos al aportarles a las biopelículas protección incluso ante fluctuaciones medioambientales de pH, temperatura y humedad, de la misma forma que la eliminación de desechos y concentración de nutrientes. Esta adhesión hacia una superficie húmeda, la cual puede ser inerte o viva es irreversible, lo cual implica que la biopelícula no podrá ser eliminada mediante lavado suave.²

Diversas publicaciones recientes señalan que, al menos el 65% de los procesos infecciosos bacterianos persistentes en humanos podrían estar asociados a biopelículas. En los más recientes 10 años, debido a su grado de incidencia, las biopelículas han sido asociadas gradualmente como factores de importancia significativa en la patogenia de múltiples infecciones humanas persistentes, entre las que se encuentran la caries dental, infección periodontal, neumonía por *Pseudomona* en fibrosis quística, endocarditis bacteriana, cistitis crónica, prostatitis crónica y osteomielitis. De este modo se ha constatado que una gran variedad de dispositivos médicos que están disponibles para su implantación pueden portar

biopelículas, causando infecciones en relación a dispositivos, una de ellas es la sepsis por catéteres endovenosos y arteriales.^{3,5}

A partir de los años '60 se ha identificado la acumulación bacteriana en tubos endotraqueales en unidades de Cuidado Intensivo.⁵ La existencia de biopelículas gram negativas en estos tubos ha sido relacionada con neumonía intrahospitalaria, por aparente diseminación mecánica durante la aspiración, en donde se han encontrado biopelículas bacterianas en 10 de 11 tubos de traqueostomía pediátrica utilizando microscopía confocal.⁵

Las patologías pulmonares en las formas crónicas de infección en el sistema urinario o del sistema biliar como lo es la fibrosis quística, patologías del sistema respiratorio como amigdalitis y sinusitis, son algunos ejemplos de alteraciones que se encuentran relacionadas con la membrana pulmonar.

Las infecciones relacionadas con biopelículas de implantes a menudo se relacionan a implantes ortopédicos (reemplazo de huesos de rodillas y cadera), catéteres urinarios y vasculares, así como marcapasos. El origen no vascular de los implantes limita el acceso de las células del sistema inmunitario a el área circundante de los mismos, por lo tanto, los pacientes perimplantados son especialmente vulnerables a las infecciones crónicas recurrentes.⁴

En la mayor parte de los casos, la terapia antimicrobiana en combinación con la exéresis del dispositivo colonizado, la escisión del dispositivo colonizado, así como la escisión quirúrgica del tejido infectado es la única forma eficaz de impedir una infección la cual se encuentre en relación con biopelículas.⁴

Los tratamientos actuales que actúan contra la biopelícula consisten en profilaxis antimicrobiana sistémica durante la colocación del dispositivo, la administración de antibiótico en los dispositivos implantados antes de la inserción, la extracción a corto plazo de un dispositivo el cual ya no es necesario, extracción quirúrgica de la biopelícula y la implantación de un régimen antibiótico contra las infecciones provocadas por la biopelícula, además de la administración de antibióticos específicos, en donde se necesitan dosis altas y ciclos de tratamiento extensos para el tratamiento de las infecciones relacionadas a las biopelículas. Este tratamiento

crónico con antibióticos puede ocasionar la resistencia de las bacterias a los fármacos y a un mayor riesgo de toxicidad por medicamentos, por lo tanto, se justifica la importancia en el empleo y búsqueda de nuevas terapias con mayor efectividad.⁵

Por otro lado, el origen de la biopelícula bacteriana, desarrolló mayor importancia a partir de mediados de los '70, con especial atención en factores pertenecientes a la diversidad de los ecosistemas, los cuales incluyen requerimientos nutricionales, potencial de oxidación-reducción y pH. Tratando de explicar la sucesión y el desarrollo de la enfermedad dental se han implementado distintas hipótesis, algunos ejemplos de ellas son la de la placa inespecífica, y otra la de la placa específica. La primera se refiere que la enfermedad periodontal, podría ser el resultado de la degradación de productos nocivos por toda la flora microbiana de la placa. Así, una gran cantidad de placa, ocasionaría un sin número importantes de sustancias nocivas, las cuales excederían las defensas del huésped originando a la enfermedad periodontal, siendo el principal agente etiológico causal el periodontopatógeno gramnegativo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, el cual integra a las principales biopelículas que se adhieren consistentemente a la superficie dentaria, de esta forma de acuerdo a esta información, la nueva clasificación de enfermedades periodontales identifica tres formas distintas de periodontitis la cual se base de acuerdo a su fisiopatología: Periodontitis necrosante, periodontitis como manifestación directa de enfermedades sistémicas, y periodontitis, en donde esta debe de ser caracterizada adicionalmente aplicando un abordaje de clasificación mediante estadios y grados.⁶

Para el desarrollo de esta formarían parte todos los microorganismos los cuales se encuentran en el interior de la placa, sin especificar la identidad de algún microorganismo en específico. Por lo tanto, las medidas de higiene oral, buscan eliminar tanto la biopelícula dental como fuera posible, como resultado, se hicieron indispensables para la conservación de la salud bucal. No obstante, la hipótesis de la placa específica menciona que un cierto número de microorganismos dentro de la placa serían patógenos, y que la magnitud del daño dependería de un crecimiento desmesurado o elección de las bacterias mas virulentas. Según esta teoría, la

enfermedad periodontal, sería el resultado de noxas celulares ocasionadas por patógenos específicos, en donde estas ocasionarían respuestas inflamatorias e inmunes derivadas del huésped.⁹

Otro tipo de infecciones polimicrobianas que prevalecen de manera persistente, son las denominadas de “sitio quirúrgico”, esto se debe a que, en la superficie de la dermis, la biopelícula incrementa mediante adherencias bacterianas, limitando la regeneración y la posterior epitelización. El desbridamiento cumple una función importante y beneficiosa, ya que posibilita la eliminación del tejido desvitalizado y de células senescentes, así como el balance de la carga bacteriana, regulando las reacciones bioquímicas que se necesitan para la cicatrización de heridas. Se han estudiado diferentes mecanismos, como lo es el desbridamiento enzimático, el desbridamiento autolítico, así como el desbridamiento mecánico.⁴⁶

ETAPAS EN EL PROCESO DE CONFIGURACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

La etapa de inicio dentro del proceso de configuración de la biopelícula es la adherencia sobre la superficie. En bacterias Gram negativas (*Salmonella enterica*, *Vibrio Cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) se ha identificado que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV, y los curli juegan un papel de importancia para la etapa de adherencia primaria. La motilidad ayuda a los microorganismos alcanzar la superficie y balancear las repulsiones hidrofóbicas. De esta forma, aunque la motilidad apoya al proceso, al parecer no es un requisito esencial, esto se debe a que muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estreptococos, estafilococos y micobacterias tienen la capacidad de conformar biopelículas. Como es el caso de las bacterias Gram positivas, se ha identificado la participación de proteínas de superficie (Bap, Esp, AtlE) en la fase de adherencia primaria. Una vez que la bacteria se ha fijado a la superficie, comienza el proceso de división y las células hijas se despliegan alrededor del sitio de unión, originando una microcolonia, de manera parecida a lo que ocurre durante el proceso de formación de colonias en medios de cultivo.²⁹

En el curso a la etapa posterior, la bacteria inicia con la secreción de un exopolisacárido que forma la matriz de la biopelícula y elabora estructuras parecidas a setas (*mushrooms*) entre las cuales se establecen la presencia de canales. La constitución del exopolisacárido es diferente entre cada bacteria, el cual se distribuye desde celulosa en *S. typhimurium*, alginato en *P. aeruginosa*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae* así como poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*. No obstante, estudios en los últimos años, han reconocido que de hecho una misma bacteria, con importancia de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede fabricar distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula. De esta forma, algunas cepas de *P. aeruginosa* tienen la capacidad de producir además del alginato un polisacárido con alta cantidad en glucosa el cual construye una biopelícula en la interfase medio aire al que se ha denominado "Pellican".³⁰

Por último, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se desintegran del mismo para colonizar nuevas superficies, finalizando el proceso del desarrollo de configuración de la biopelícula. La liberación de las bacterias desde la biopelícula es el proceso menos conocido. Refiriéndonos a *Staphylococcus aureus* se ha establecido un proceso de cambio de fase estimulado por la inclusión reversible de un elemento de inserción (IS256) en la parte interna del operón (*icaADBC*) el cual tiene la responsabilidad de la síntesis del exopolisacárido de la biopelícula. El mecanismo de inserción del elemento puede ocurrir aleatoriamente en la población con una frecuencia de 10^{-6} y produce bacterias con deficiencia en la síntesis del exopolisacárido y por lo tanto con deficiencia en la elaboración de la biopelícula. Esto tiene la capacidad de permitir a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población la cual tiene la capacidad de sintetizar el exopolisacárido y poder evadir a la biopelícula. Como la inserción es un proceso que puede revertirse, el salto del IS desde el operón *ica* podrá dar origen a una nueva variación de fase. Otra alternativa identificada en *S. aureus* tiene relación con la obtención de variantes limitadas en la elaboración de la biopelícula, esto se debe a la eliminación de una isla de patogenicidad la cual contiene elementos importantes para el proceso de formación de la biopelícula. Refiriéndonos a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, se ha establecido una actividad enzimática llamada dispersina, la cual tiene la capacidad de degradar de forma específica el exopolisacárido de la matriz de la biopelícula. La existencia de distintos genomas de hipotéticas proteínas (endoglucanasas), los cuales pueden ser responsables de una función parecida, menciona que la degradación controlada del exopolisacárido puede ser la responsable de un mecanismo controlado de libertad de bacterias formadoras de biopelícula.

La interfase sólido-líquida entre una superficie y un medio acuoso (sangre, agua) acondiciona un entorno idílico para la fijación y crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, las biopelículas son ubicuos en la naturaleza y se localizan básicamente en toda superficie natural de agua en el mundo.⁷

REGULACIÓN DEL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

Considerables evidencias experimentales describen que el proceso de formación de la biopelícula permanece controlado por una intrincada cascada de reguladores. Un trabajo precursor con *P. aeruginosa* evidenció que el proceso de formación de la biopelícula está regulado por un mecanismo de *quorum sensing* o autoinducción. El método de *quorum sensing* es un mecanismo de autoregulación el cual es dependiente del cúmulo en el medio ambiente de una molécula señalizadora y autoinductora, la cual permite a la bacteria el poder identificar la concentración de población existente. Específicamente en bacterias Gram negativas el principal autoinductor es acilhomosiderina lactona, mientras que en bacterias Gram positivas el autoinductor son péptidos. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, este llevará a cabo un activación de un receptor específico que alterará la expresión de genes modificando distintos fenotipos. Con relación al *quorum sensing*, se ha identificado una molécula llamada “Furanona” la cual es elaborada por el alga *Delisea pulcra*, con una configuración similar a las acylhomoserina lactonas. Estas moléculas se adhieren a los mismos receptores, pero en lugar de activarlos, los bloquean, de esta forma llevan a cabo la inhibición de la consiguiente formación de la biopelícula. En el tiempo actual se está tratando de desarrollar inhibidores para la formación de la biopelícula los cuales se basan en derivados de la furanona, debido a que esta molécula es extremadamente tóxica. De manera similar en *S. aureus*, se ha identificado un péptido llamado RIP, el cual inhibe uno de los sistemas de *quorum sensing* y el proceso de formación de la biopelícula.¹⁰

Además del quorum sensing, existen otros reguladores globales como CsrA en *E. coli*, CytR de *V. cholerae*, los cuales han demostrado que son determinantes importantes en el desarrollo de la biopelícula afiliada a estos microorganismos.

Además de la regulación a nivel transcripcional, existen múltiples indicios acerca de la existencia de una regulación postranscripcional sobre el mecanismo de la formación de la biopelícula. De esta forma, la promoción de la síntesis de la celulosa en *S. typhimurium* se desarrolla por el activador alostérico c-diGMP. La

concentración de este activador requiere de dos actividades enzimáticas, fosfodiesterasa y diguanilato ciclasa, conjugadas a enzimas que comprenden los dominios EAL y GGDEF. En *S. typhimurium* pertenecen al menos 21 proteínas que contienen estos dominios, y no se conoce si todas estas proteínas alteran la regulación del mecanismo de síntesis de celulosa en diversas condiciones ambientales o si son responsables de alguna otra función.

De tal modo, se considera lógico pensar que la formación de biopelículas se produce en respuesta a las condiciones medioambientales y por lo tanto, que existan sistemas de fosfotransferencia de dos componentes los cuales transmitan la señal del medio ambiental al interior de la célula bacteria con la finalidad de adecuar la expresión génica a la nueva situación ambiental.³¹

BIOPELÍCULA EN CAVIDAD BUCAL

La placa dental es uno de los ejemplos más claros de una biopelícula y los estudios que se han realizados sobre ella han proporcionado un aporte importante para el conocimiento de la etiología y las alternativas en el control de la caries dental y la enfermedad periodontal.

Con la finalidad de identificar los factores ecológicos claves que influyen en los patrones de colonización, es de suma importancia entender las propiedades de la cavidad bucal. En un inicio, la boca se encuentra de manera constante lubricada por la saliva, manteniendo una temperatura de 35-36°C y un pH de 6.7 en condiciones inmejorables para el crecimiento de muchos microorganismos. Posterior a esto, la saliva contribuye profundamente en la ecología de la boca, por ejemplo, su constitución iónica incrementa sus propiedades de amortiguación y su capacidad para remineralizar el esmalte. Sin embargo, los componentes orgánicos (proteínas y glicoproteínas) pueden contribuir en el establecimiento y crecimiento de la microflora oral, al favorecer la agregación de ciertos microorganismos mediante la formación de una película específica acondicionadora sobre la superficie del esmalte, o la exclusión de bacterias a través del depurado salival, de esta forma también puede actuar como nutriente endógeno. Así mismo, la saliva incluye elementos de la inmunidad innata y adquirida, de esta forma tiene la capacidad de inhibir directamente algunos microorganismos exógenos.³²

El funcionamiento de las bacterias al interior de una comunidad está dado por las capacidades biológicas de cada población microbiana. Las especies con funciones similares en un hábitat contienden por el mismo nicho. La existencia de diversas especies dentro de un mismo entorno, se debe a que cada una de ellas mantiene una función diferente y de esta forma se interrelaciona con las otras.

La microflora de la placa dental, procede de distintos sitios de la superficie dental, la cual, mantiene diferencias en su composición. Estas variantes resultan de las diferencias particulares referente al suministro de nutrientes, al potencial redox y al pH.³³

Hablando específicamente de la distribución de nutrientes, estos engloban dos categorías: 1) Nutrientes endógenos, mediados por las glicoproteínas y proteínas derivadas de la saliva y del fluido crevicular y 2) Nutrientes exógenos, regulados por los hidratos de carbono adquiridos mediante la dieta. Los carbohidratos fermentables son los nutrientes que en mayor parte de las veces alteran la ecología microbiana de la cavidad bucal. El metabolismo intracelular de los carbohidratos, regulado por las bacterias, conlleva a la elaboración de ácidos que se encargan de mantener en un medio ácido la biopelícula dental.

Reririendonos al pH, la mayoría de estas especies bacterianas de la cavidad bucal, se desarrollan dentro del rango de pH relativamente limitado. Un pH neutro no se relaciona con un impacto sobre los niveles de las especies del grupo mutans, sin embargo, un pH bajo lleva a un incremento de estos microorganismos.³⁴

Los organismos anaerobios pueden limitar el daño de los efectos tóxicos del oxígeno, interrelacionándose con especies las cuales lo consumen, dando como resultado su disminución a niveles que dan paso al crecimiento de los primeros.

La placa dental se describe como una comunidad microbiana que se localiza sobre la superficie dental, la cual involucra una biopelícula embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival. Se localiza en la boca de individuos sanos y enfermos, y es el agente etiológico de dos de las enfermedades bucales con mayor prevalencia hoy en día: la caries dental y la enfermedad periodontal.

Costerton en 1978 acuñó el término *biofilm*, o biopelícula, la cual se define como la formación de agregados bacterianos, generalmente existentes como comunidades íntimamente asociadas, las cuales se adhieren a una variedad de superficies artificiales y naturales, en un medio acuoso el cual abarca una concentración suficiente de nutrientes para permitir las necesidades metabólicas de la microbiota.

Se ha identificado que las células bacterianas de la biopelícula presentan características biológicas que se diferencian marcadamente de las bacterias de las cuales se encuentran aisladas o en suspensión.³⁵

Las biopelículas forman parte de una comunidad microbiana resguardada por una amplia variedad de factores antibacterianos y que sobresalen en cualquier ecosistema que dispone de un nivel suficiente de nutrientes. Todas las biopelículas presentan una fisiología y una estructura compleja, que les permite desarrollar y conservar un ecosistema con la apertura de canales de agua, los cuales recorren a través del interior de la arquitectura de la misma.

La configuración de la placa dental depende de un patrón establecido de colonización. Los primeros colonizadores pueden establecerse cerca de la superficie dental por medio de interacciones físico-químicas las cuales no son específicas entre las moléculas precargadas provenientes de la superficie del huésped y de la superficie bacteriana. Posterior a esto, se instauran una serie de interacciones intermoleculares determinadas las cuales son bastante fuertes entre los receptores complementarios de la película adherida y las adhesinas bacterianas, las cuales dan como resultado una adherencia no reversible. Los primeros colonizadores posterior a esto crecen, modifican sus condiciones medioambientales locales y modifican su ecosistema un medio el cual es favorable para la posterior colonización de especies anaerobias.³⁶

Esos últimos colonizadores se enlazan a diversas especies bacterianas ya adheridas a través de la co-adhesión. De esta forma se desarrollaran biopelículas estructurales múltiples compuestas por diversas especies de microorganismos.

La placa dental, mediante el paso del tiempo, se transforma en una estructura totalmente organizada específicamente con organismos que mantienen posiciones específicas predefinidas, esto debido a las características biológicas y físicas del lugar en el que se encuentran, dando origen a lo que la mayoría de los investigadores han denominado “mosaico de microorganismos”

Un rasgo distintivo importante de una comunidad microbiana es la conservación de una microflora permanente en un medio inestable. Tal estabilidad ha sido denominada “homeostasis microbiana”. Esto no implica que no exista actividad metabólica alguna entre las poblaciones microbianas que estructuran la placa. De

forma opuesta, esta estabilidad es el efecto de un equilibrio dinámico, mantenido por una serie de interacciones, las cuales se presentan de manera antagónica o sinérgica entre los diferentes grupos microbianos. Estas interacciones prevalecen el catabolismo de nutrientes endógenos (proteínas y glicoproteínas) y suministra protección ante las presiones del medio, a través del mantenimiento de un medio local favorable, aún, tomando en consideración, las fluctuaciones desfavorables temporales que puedan presentarse en el microambiente. Estas interacciones dan la oportunidad a los organismos que permanecen al interior de una comunidad, a persistir y desarrollarse sobre un hábitat más amplio y poner en marcha acciones sinérgicas en la reutilización de nutrientes, incrementando de esta manera la eficacia metabólica al interior de una comunidad.³⁷

Por otra parte, las interrelaciones antagónicas entre los microorganismos, son un factor que permite la resolución sobre la composición de las comunidades microbianas de la placa dental. La liberación de compuestos antagónicos como lo son las bacteriocinas, o sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas, dan oportunidad a un organismo determinado una ventaja competitiva cuando interactúa con otros.

Se han llevado a cabo estudios experimentales en animales los cuales han permitido identificar que la facultad de inducir caries dental no es una habilidad propia de alguna especie en particular y han permitido establecer que los estreptococos del grupo mutans (*Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans*) y los lactobacilos son las bacterias cariogénicas más patogénicas.

Van Houte menciona que se han localizado streptococos, que no forman parte del grupo mutans, con la facultad de producir ácido y disminuir el nivel de pH, en relación con algunas lesiones de caries dental en humanos. Este descubrimiento señala que otras especies podrían, de manera ocasional, estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad. Estas observaciones favorecen la idea de que si bien, el grupo mutans se encuentra de manera común en las lesiones de caries temprana,

no se debería excluir la presencia de otras especies de estreptococos como factibles agentes etiológicos del inicio y progresión de la enfermedad.³⁸

Durante el paso del tiempo, y con el avance de las investigaciones científicas, las teorías expuestas en relación a la importancia de la placa bacteriana en el inicio de la caries dental han ido avanzando.

La hipótesis de la “placa específica”, propuesta por Loesche en 1976, menciona que, aunque la microflora bacteriana residente de la placa comprenda una múltiple cantidad de microorganismos, solo algunas especies se encontraban de manera activa en la progresión de la enfermedad.³⁹

Posterior a esto, Theilade en 1986, enunció la hipótesis de la “placa no específica”. Menciona que la caries dental es el resultado de la actividad total de la microflora global de la placa. De esta manera, la coordinación heterogénea de microorganismos prevalecen para el desarrollo de la enfermedad.⁴⁰

De manera posterior, se ajustaron los elementos principales de ambas hipótesis. La hipótesis de la “placa ecológica”, enunciada por Marsh y argumentada por una gran cantidad de estudios, menciona que los organismos los cuales se encuentran en relación con la enfermedad pueden mantenerse de manera continua en los sitios sanos, pero en niveles extremadamente limitados, que no son clínicamente relevantes. La enfermedad resultaría de las alteraciones ocurridas en el equilibrio de la microflora que reside en la placa, como resultado de las alteraciones en las condiciones medioambientales locales, por ejemplo, en las cuales se encuentra de forma repetida un pH bajo en la placa posterior al consumo reiterado de azúcares que apoyan al incremento en el establecimiento de las especies cariogénicas y la limitación constante del flujo salival.⁴¹

Refiriendonos específicamente a la caries dental, esta puede localizarse de manera natural al interior de la placa dental, en relación a bacterias con un potencial cariogénico. No obstante, en un pH neutro estos microorganismos no presentan una alta competitividad, en donde estos se localizan solo en una proporción muy

limitada. En esta circunstancia y con una ingesta de alimentos poco cariogénica, los niveles de estos microorganismos con potencial patógeno son clínicamente imperceptibles, de esta manera, se instaura un equilibrio en el mecanismo de desmineralización-rem mineralización. De otro modo, si se incrementa la frecuencia en el consumo de carbohidratos fermentables, la placa persistirá por un tiempo prolongado por debajo del pH crítico para el esmalte (pH 5.5) ocasionando la alteración de la ecología microbiana de la placa. Un pH bajo permite el incremento de bacterias acidogénicas y acidúricas, lo cual lleva el proceso hacia la desmineralización.³⁸

COLONIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS EN CAVIDAD BUCAL

La colonización derivada de microorganismos específicos abarca diferentes fases que comprenden el depósito, adhesión, coagregación, crecimiento y reproducción de los microorganismos adheridos sobre la película adquirida. Posterior a la formación de la película adquirida, ésta será colonizada por microorganismos residentes de la cavidad bucal. Las bacterias se adhieren específicamente a las glucoproteínas encontradas en la película adquirida la cual se encuentra depositada en la superficie del esmalte, de manera casi inmediata. Algunos de los mecanismos que resultan en que las bacterias se adhieran a la película adquirida son: por medio de moléculas específicas, llamadas “adhesinas”, las cuales se localizan en la superficie de las bacterias las cuales se unen con algunos receptores específicos de la película; mediante estructuras proteínicas fibrosas, denominadas “fimbrias”, las cuales se fijan a la película; mediante la formación de enlaces de calcio (Ca⁺⁺) y magnesio (Mg⁺⁺) cargados positivamente, los cuales permiten la unión de componentes bacterianos con carga negativa a la película la cual posee la misma carga; y mediante polisacáridos extracelulares sintetizados con base en la sacarosa, los cuales permiten la unión de polisacáridos bacterianos hacia la superficie de la película.⁴²

El primer microorganismo en adherirse a la superficie de la película adquirida es *Streptococcus sanguis* y de esta forma, da inicio a la colonización microbiana en la

formación de placa dental supragingival para posteriormente llevar a cabo la adhesión de *Actinomyces viscosus*. Algunos mencionan que *S. sanguis* y *A. viscosus* son los microorganismos iniciales en la colonización de la placa dental, y que el trabajo en conjunto de ambas bacterias sobre la superficie del diente es considerado como un requisito fundamental para la posterior colonización de especies de *Fusobacterium* y *Veillonella*. Otras especies que dan inicio al proceso de colonización son *Streptococcus* del grupo oralis (*S. oralis*, *S. mitis*), *Neisserias* sp; *Actinomyces* sp y *Haemophilus* sp.⁴³

Posterior a siete días de llevada a cabo la formación de la placa dental, las especies de *Streptococcus* continúan siendo el grupo predominante, pero posterior a las dos semanas los bacilos anaerobios y las formas filamentosas comienzan a proliferar. Estas modificaciones microbianas que se van generando van unidas a diferentes causas, tales como: producción de H₂O₂; antagonismo por competencia de sustratos; y exclusivamente por el consumo de oxígeno en el ambiente, esto derivado de una sustitución de especies bacterianas Gram positivas facultativas por especies bacterianas anaerobias facultativas y estrictas Gram negativas, mecanismo denominado Sucesión Autogénica. Grupos de investigadores mencionan que los microorganismos que se adhieren de manera secundaria a las bacterias presentes en la superficie de la placa son *P. intermedia*, *Capnocytophaga* sp; *Prevotella loescheii*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, estos microorganismos se adhieren a otras bacterias ya presentes en la masa de la biopelícula dental.³³

Un hecho que desempeña un papel sobresaliente en el desarrollo y la posterior maduración de la biopelícula dental, es el fenómeno de Coagregación entre células microbianas, mediante el cual, la adherencia de nuevas células microbianas se lleva a cabo sobre la primera capa de los microorganismos que ya se encuentran unidos a la superficie del diente. Estas interacciones ocurren específicamente debido a la acción de proteínas de tipo lectinas y menos específicas las cuales dan origen a las fuerzas electrostáticas, hidrófobas, y de van der Waals. Se han definido coagregaciones entre *S. sanguis* con *A. viscosus*, *A. naelundii*, *Corynebacterium matruchotii* y *F. nucleatum*, entre *P. loescheii* con *A. viscosus* y entre

Capnocytophaga ochracea con *A. viscosus*. También entre especies Gram positivas como *Streptococcus gordonii*, *S. mitis*, con *C. matruchotii* o con *Propionibacterium acnes*; entre especies Gram positivas con Gram negativas como *Streptococcus sp*; *F. nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella sp*, y entre especies Gram negativas como *Prevotella melaninogenica* con *F. nucleatum*.⁴⁴

En las fases definitorias de la formación de la biopelícula, es característico que predomine la coagregación entre especies Gram negativas anaerobias, como *F. nucleatum* con *P. gingivalis*. Este fenómeno proporciona las condiciones para la interacción patogénica característica de las infecciones periodontales.

ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA BIOPELÍCULA DENTAL

La idea de que la caries dental da inicio como resultado de las alteraciones medioambientales del hábitat microbiano, tiene como constituyente de manera implícita determinante de que esta enfermedad podría prevenirse no solamente combatiendo de manera directa a los patógenos asociados, sino también afectando los factores ocasionantes de su crecimiento.

En el caso de la caries dental, los hábitos regulares sobre la ingesta de azúcar/pH bajo, aparentan ser los mecanismos iniciales que perturban la homeostasis microbiana. Las estrategias constantes asociadas con la prevención de la enfermedad, de acuerdo a los principios de la hipótesis de la placa ecológica, incluyen: a) Limitación sobre la producción de ácido (empleo de fluoruros), b) alteración en el desarrollo de la biopelícula (empleo de agentes antiplaca como la clorhexidina y el triclosan), c) evadir la ingesta de azúcares fermentables entre las comidas, d) consumir alimentos y/o bebidas que contengan azúcares no fermentables (sorbitol, xilitol, aspartame, sacarina) y e) estimulación del flujo salival posterior a las comidas principales (empleo de gomas de mascar libres de azúcar)⁴⁵

BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Una de las características que mejor define a las infecciones crónicas las cuales se encuentran relacionadas con biopelículas en infecciones agudas es su capacidad para responder a tratamientos con antibióticos. En tanto que las infecciones agudas pueden ser suprimidas posterior a un corto tratamiento de antibióticos, las infecciones relacionadas con biopelículas comúnmente no consiguen ser eliminadas de manera completa, de esta forma producen episodios reiterados y la mayor parte de las veces deben solucionarse sustituyendo el dispositivo implantado. Esto es debido a que los microorganismos de las biopelículas pueden presentar hasta 1,000 veces mayor resistencia a los antibióticos que las mismas bacterias crecidas en medio líquido.

¿Cuáles son los factores ocasionales de esta mayor resistencia a los antibióticos? Los factores de la resistencia de las bacterias en biopelículas se encuentran en investigación aún, sin embargo, entre los motivos principales discutidos abarcan:

- 1.- Los mecanismos de barrera en la difusión física y química con relación a la penetración de los antimicrobianos que compone la matriz de exopolisacáridos.
- 2.- El crecimiento ralentizado de los microorganismos asociados a la biopelícula, esto debido a la limitación en la disposición de sus nutrientes.
- 3.- La presencia de microambientes antagónicos con la acción de los antibióticos.
- 4.- La activación en las respuestas asociadas al estrés que estimulan cambios en la actividad fisiológica de las bacterias y la posterior presencia de un fenotipo específico de la biopelícula que de manera activa contrarreste los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas.

De todos estos posibles factores, la mejor respuesta para poder entender la pobre eficacia de los antibióticos sobre los microorganismos asociados en biopelículas definitivamente se considera la incapacidad de los antibióticos para poder penetrar a través la biopelícula actuando sobre la matriz exopolisacáridica. Si bien, aun

cuando distintos estudios en los que se menciona que la capacidad para penetrar por parte de los antibióticos a través de las biopelículas de *P. aeruginosa* han demostrado que la matriz de la biopelícula modifica la velocidad de penetración de los antibióticos (fluoroquinas penetran rápidamente y los aminoglucósidos mas lentamente), pero en inicio todos los antibióticos experimentados tienen la capacidad de penetrar hasta zona mas interna de la biopelícula en unas horas y poder alcanzar concentraciones bactericidas para los microorganismos plactónicos.⁴⁶

Una problemática adicional para la práctica clínica relacionada con la resistencia de las biopelículas a los antibióticos es la falta de metodologías estandarizadas de uso repetido para identificar y determinar la sensibilidad de las bacterias de una biopelícula a los antimicrobianos. Se han llevado a cabo intentos para poder adaptar métodos desarrollados en laboratorios de investigación, pero aún no se han adoptado ningún tipo protocolo estandar para lograr este fin. Entre estos métodos, sobresalen por su capacidad de adaptación al diagnóstico clínico el método descrito por Amorena y col y el método denominado "*Calgary biofilm system*"

En el método inicial, la biopelícula es desarrollada sobre pocillos de placas microtiter, esto se establece durante distintos periodos de tiempo, los cuales se exponen a los tratamientos con antimicrobianos, en donde la cantidad de microorganismos viables que han resistido al tratamiento se cuantifica determinando la cantidad de ATP por bioluminiscencia. En el método "*Calgary biofilm Device*" se utiliza una placa tipo microtiter con una tapa especial. Esta placa consta de 96 púas que se introducen y ajustan de manera adecuada sobre cada uno de los pocillos de las placas microtiter. Las biopelículas que se formaron sobre las púas de la tapa se pueden llevar a otra placa para su exposición a la acción de distintas concentraciones de antimicrobianos. Finalmente, el número de bacterias viables se cuantifican empleando recuentos en medios de cultivo.⁴⁷

CONSTRUYENDO UNA BIOPELÍCULA. MODELOS *IN VITRO* DE BIOPELÍCULA DENTAL

Como se ha comentado anteriormente, el medio ambiente bucal humano forma parte de un complejo nicho en el que los microorganismos de los tres dominios se encuentran asociados formando biopelículas de manera constante, y en donde las bacterias específicamente constituyen el principal componente de las mismas, con alrededor de 1200 taxones bacterianos presentes. A pesar de que una amplia cantidad de estudios de investigación se encuentran desarrollando y aplicando nuevas de biología molecular y de técnicas de cultivo con la finalidad de poder describir el microbioma oral, aun se encuentra en una situación inicial en términos de comprensión y análisis de la actividad de estas comunidades microbianas asociadas en biopelícula. De esta forma, la biopelícula dental, específicamente la placa dental, es el principal agente etiológico de algunas de las enfermedades más prevalentes del ser humano, como lo son las enfermedades periodontales y la caries dental, además de encontrarse en íntima relación con enfermedades sistémicas. Agregado a todo esto se incrementa la resistencia de las bacterias en calidad de biopelícula en tratamientos antimicrobianos, que es casi 10000 veces superior en estado plactónico.

Se encuentra referenciado en la literatura científica como diferentes grupos de investigación han desarrollado modelos que representan a la biopelícula dental, además de que faciliten el estudio en relación a su estructura, la dinámica de la comunidad microbiana que albergan, los distintos determinantes ecológicos que marcan patrones en su formación y desarrollo, o su posible sensibilidad y resistencia a agentes antibacterianos.⁶⁴

Con esta finalidad se han utilizado diversas tecnologías, las cuales se encargan de coordinar diferentes tipos de inóculos bacterianos de inicio y mecanismos de generación. Entre los diversos tipos de inóculos bacterianos se han desarrollado férulas parciales las cuales se insertan en pacientes, biopelícula dental de pacientes como inóculo, o agrupaciones definidas de especies bacterianas. Refiriendonos a

la actividad constante del sistema, se ha propuesto el desarrollo de modelos en un modo pasivo, llevando a cabo el empleo de placas de cultivo microtiter, o en modo activo, empleando biogeneradores específicos. De este modo, se encuentran limitados los modelos de especies múltiples descritos en la literatura hasta estos días, los cuales puedan reproducir las condiciones medioambientales específicas de la biopelícula dental, debido a que la mayor parte de ellos no presentan una distribución específica de especies altamente representativas.

FITOTERAPIA

En un inicio de los tiempos antiguos el hombre ha buscado herramientas con la finalidad de limitar sus dolencias físicas y alargar su vida. Estos acontecimientos se han identificado con la existencia de registros históricos, de civilización en civilización, hasta llegar a los días actuales. Sin embargo, el hombre en pleno siglo XXI no ha sido capaz de evitar la muerte, en donde solamente a podido mitigar síntomas de enfermedades y evitar el progreso de algunas otras. En épocas en las cuales el hombre solamente contaba a su disposición con los recursos otorgados por el planeta, buscó en estos elementos las bases adecuadas para mitigar el dolor físico y evitar la muerte. De los recursos con mayor beneficio aprovechados por diversas culturas con el paso de la historia, pertenecen los recursos animales, vegetales y minerales. Estos integraron hasta finales del siglo XX los recursos terapéuticos de mayor relevancia.⁴⁸

Uno de los reinos existentes en la naturaleza el cual contribuye en la actualidad para la disminución de los síntomas y la prevención de las diferentes enfermedades, es sin duda el reino vegetal. Las plantas y los vegetales, debido a su maravilloso y complejo metabolismo, integran un verdadero armamento bioquímico, del cual, solo se ha podido estudiar con éxito solo un tercio de la amplia gama de especies existentes a nivel mundial y aquellas inexploradas hasta hoy, sin considerar a las especies ya extintas.

Fue de esta manera como cada parte de los distintos territorios del mundo desarrollaron diferentes mecanismos de cura con base en plantas medicinales la cual es única y característica, debido a que se utilizaban especies endémicas de las regiones en cuestión. Con el paso del tiempo, cada una de estas terapias características locales se transformaron para poder formar parte de la conocida medicina tradicional, y de esta forma al ser conservada por los pueblos originarios fue denominada también medicina aborígen o autóctona, conservando estos términos hasta nuestros días, de esta forma al igual que las recetas tradicionales o

autóctonas las cuales agrupan tanto su uso, formas de preparación, administración, dosis, entre otros parámetros farmacológicos modernos.

Paracelso, el padre de la Farmacología Química, químico y médico suizo en pleno Renacimiento, fue el primero en mencionar que las propiedades medicinales de las plantas derivan de sus principios activos aislables por técnicas químicas. Este análisis constituyó los fundamentos de la Farmacología Moderna.

Posterior a esto y debido al desarrollo de la síntesis química, diversos científico lograron desarrollar núcleos básicos de moléculas exitosas extraídas de la naturaleza con la finalidad de mejorarlas y lograr un porcentaje aun mayor de selectividad, eficacia y seguridad.⁴⁹

De esta forma es como la actualidad terapéutica hoy en día, se encuentra gobernada por la química sintética, en donde el conocimiento que para pocos es compartido se basa en que estas exitosas moléculas que curan no son, sino copias de sustancias químicas mejoradas que la naturaleza creó de manera espontánea. En la actualidad y desde hace aproximadamente dos décadas se ha observado un interés especial por el uso de plantas medicinales en los países desarrollados del mundo occidental. Por ejemplo, en los últimos años, la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares se ha asociado con la ingesta de frutas secas, vegetales o infusiones ricas en antioxidantes naturales. Existe una gran cantidad de estudios los cuales mencionan que un incremento en la ingesta de estos compuestos se relaciona con un riesgo menor de muerte por estas enfermedades las cuales incluyen, además, aterosclerosis, hipertensión arterial y diabetes melitus. Estas enfermedades son las causas principales de muerte en los países industrializados.⁵⁰

La fitoterapia es un neologismo utilizado por Henri Leclerc, médico francés (1870-1955) a inicios de siglo, y desde entonces la palabra fitoterapia es empleada para designar el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos, los cuales servirían posteriormente para poder diferenciar la forma de curar actual de la medicina convencional o sintética. En 1981 ya contaba con una definición más

establecida: *“la terapia complementaria en la cual se emplean plantas o partes de ellas donde el empirismo de la medicina tradicional se transforma en fundamento científico”*, en otras palabras a la medicina tradicional o autóctona se le pone a prueba en laboratorios que continúan el método científico para posteriormente llevar a cabo la validación o descartar su uso popular. De esta forma organizaciones e instituciones mundiales se han encargado de este aspecto y publican sus resultados para de esta forma poder asegurar el correcto uso, seguridad y eficacia de los recursos medicinales vegetales. A pesar del reconocimiento por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la principal problemática para lograr armonizar la fitoterapia con la denominada medicina convencional no ha logrado ser resuelta del todo. La OMS reconoce el grado de importancia por parte de las plantas medicinales para el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, así como también la relevancia a nivel económico debido a que constituyen una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tienen un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos. El retorno al interés científico sobre las plantas medicinales, y de esta forma investigar sus principales características y variabilidad química, ha incrementado a una revalorización sobre su empleo en muchas partes del mundo, asociándolo una forma complementaria de curar, de forma que el empirismo de la terapia, queda de lado de acuerdo a la evidencia científica, combinando la medicina tradicional con las terapias oficiales de cada país.⁵⁴

CARACTERÍSTICAS DE LA FITOTERAPIA

En comparación con la medicina convencional o sintética, la fitoterapia utiliza matrices vegetales complejas. Estas matrices las constituyen plantas enteras, partes de ellas (hojas, raíces, etc), y también subproductos de estas, debido a tratamientos directos con algún disolvente o medio que concentre los compuestos específicos y facilite su administración, son los llamados extractos. En cualquiera de los casos, en esta matriz compleja se encuentra con una gran cantidad de compuestos de diferente naturaleza química, a esta mezcla se le llama fitocomplejo.⁵¹

El fitocomplejo es la mezcla de sustancias activas y otras accesorias las cuales actúan en conjunto para lograr un determinado fin terapéutico, el cual no sería el mismo si se administraran de manera independiente, o sea como monosustancias.⁵²

Estas sustancias activas son denominadas como metabolitos secundarios y se especifican a las sustancias las cuales son el subproducto de la fotosíntesis y las cuales intervienen en procesos vegetales como la defensa frente a patógenos y protección a los rayos UV, entre otros. La mezcla de metabolitos secundarios es única para cada especie, debido a que su biosíntesis se determina principalmente por la genética vegetal, y de esta forma influye en el estrés, la fisiología, la procedencia geográfica y las condiciones específicas de recolección del vegetal, aunado a otros factores.⁵³

Los metabolitos secundarios se derivan de compuestos que dependen exclusivamente de la orden genética y por lo tanto son biosintetizados siguiendo diferentes rutas metabólicas, de esta forma se pueden encontrar compuestos de la familia tarpénica como las saponinas y aceites esenciales; fenólica como los flavonoides; esteroidea como los cardiotónicos y fitohormonas, alcaloidea (alcaloides varios como la cafeína); y polímeros heterogéneos como las gomas y mucílagos.

De forma común se confunde la fitoterapia y el concepto de fitocomplejo en relación a los fitofármacos los cuales ya forman parte de la terapia convencional. Algunos metabolitos secundarios por su alta actividad no necesitan de la acción sinérgica de los componentes del fitocomplejo para poder llevar a cabo una acción biológica potente los cuales presentan un estrecho margen terapéutico, como los cardiotónicos y los alcaloides. En estas situaciones se prefiere purificar, aislar y elaborar productos destinados a contrarrestar enfermedades crónicas y delicadas como la insuficiencia cardiaca y el dolor asociado a enfermedades terminales, con la finalidad de manejar exactamente su dosis, y de esta manera, evitar intoxicaciones que son inherentes a la alta actividad de este tipo de compuestos, como lo son los fitofármacos.

Sin embargo, compuestos de mediana y baja actividad también presentan posibilidades limitadas para ejercer toxicidad. En este grupo se encuentran los polímeros heterogéneos, compuestos fenólicos y terpenos en general. Considerando lo anterior, este es el terreno de la fitoterapia y del fitocomplejo que en su forma natural (planta medicinal) o procesada (extractos y productos que los contengan), llevarán a cabo la conformación de lo que se denomina como fitomedicamento.⁵⁵

SEGURIDAD

Esta terapia poco invasiva y eficiente ha generado riesgos inherentes a conceptos equívocos que la humanidad ha confundido por siglos.

1.- ¿Medicina Alternativa o Complementaria?

Si la fitoterapia pasiva es una terapia en la que se emplean mezclas de sustancias de regular a poca actividad, esta podrá ser útil en afecciones de la misma gravedad, además de espontáneas, moderadas, reversibles o bien para disminuir síntomas leves de afecciones crónicas o limitar su progresión. En este último de los casos las constituirá solamente un complemento, así como también en la prevención de eventos degenerativos.⁵⁴

Una terapia pasiva solo puede conservarse como una alternativa en situaciones de la misma índole, por lo tanto, el término alternativo será ser relativo, debido a que si se utilizan los beneficios de las plantas medicinales para limitar las molestias y síntomas de enfermedades crónicas o graves que son tratadas por un medicamento altamente efectivo derivado de la medicina tradicional, los cuales incluyen a los fitofármacos, mencionamos a la fitoterapia como terapia complementaria.⁴⁹

El término alternativo puede llevar a graves errores terapéuticos. Cuando hablamos de una alternativa nos referimos a la capacidad de poder elegir una alternativa por encima de otra. Cuando esta elección forma parte de una terapia pasiva en una enfermedad aguda o grave de cierta manera no es la alteranativa correcta. Por lo tanto cualquiera que sea el padecimiento lo importante sería considerar, al referirse a la fitoterapia, en lugar de una terapia complementaria, de esta manera no determina la opción de tratamiento convencional o bien, otros complementarios.⁴⁹

2.- ¿Es bueno todo lo natural?

De manera constante, en la mayor parte de la población, se encuentra presente la idea de que “todo lo natural es bueno”, “sin importar la cantidad de consumo, si se obtiene a partir de la naturaleza será benéfico para la salud” etc. La población no

agrupa el concepto de medicamento con plantas medicinales, y en teoría lo son. Un fármaco es toda aquella sustancia la cual provoca un efecto en el organismo; si el efecto es positivo lo denominamos medicamento y si no lo es se convertirá en un tóxico o veneno. Que un fármaco tenga el comportamiento de un veneno o medicamento va a depender principalmente de los siguientes factores: vía de administración, dosis, susceptibilidad del paciente y por sobretodo que éste realmente lo necesite. En el ámbito de las plantas medicinales en su forma natural o sus productos farmacéuticos, se emplea y abusa el uso de sus propiedades farmacológicas sin siquiera necesitarlas.

ALLIUM SATIVUM – DIALIL DISULFURO

Allium sativum (ajo) se ha empleado como medicina desde tiempos antiguos, el cual, se ha utilizado debido a sus bondades como agente antibacterial, antiviral, antifúngico, antialgal, antiproteolítico, anticancerígeno, antitrombótico, antiesclerótico, antioxidante e inmunomodulador. En tiempos recientes se ha demostrado que el *Allium sativum* dispone de una actividad antimicrobiana poderosa de amplio espectro, la cual incluye la actividad contra las bacterias de la cavidad bucal.²⁵ El principal componente antimicrobiano del *Allium sativum* se ha reconocido como el compuesto de azufre oxigenado alicina, el cual no se encuentra presente en el ajo crudo, sino que se forma rápidamente por la acción de la enzima alinasa, cuando el ajo se procesa y tritura. A pesar que se ha demostrado que la alicina es un agente antimicrobiano potente de manera *in vitro*, sus efectos *in vivo* aun son controvertidos. Estudios identificaron que la alinasa se inactiva mediante el incremento de temperatura, lo que evita la conformación de alicina. Los aceites de *Allium sativum* incluyen compuestos organosulfurados importantes, los cuales comprenden el sulfuro de dialilo, el disulfuro de dialilo, así como el trisulfuro de dialilo. Estos compuestos disponen de un potente anticancerígeno, actividades de modulación inmunitaria antioxidante y antiinflamatoria, así como propiedades antimicrobianas. En estudios reciente se menciona que el dialil disulfuro actuó de

manera sinérgica cuando se combinó con antibióticos contra cepas resistentes como, *Enterobacter cloacae*, *E. fecalis*, *E. coli* y *Citrobacter freundii*. Con base en los resultados de estudios previos, se propone que el dialil disulfuro es eficaz contra *Agregatibacter actinomycetecomitans*.¹⁴

El consumo de ajo fresco y cocido, así como su uso complementario, se toleran de manera adecuada a un nivel razonable en la alimentación diaria y se catalogan como “generalmente seguros” por parte de la Administración Estadounidense de Alimentos y Medicamentos (FDA). El uso del ajo se ha llevado a cabo durante mucho tiempo como planta etnomedicinal para poder contrarrestar enfermedades infecciosas. Se ha comunicado que la ingesta de ajo fresco o la administración intravenosa de sus extractos se utiliza para contrarrestar diversas infecciones virales y en pacientes con meningitis criptocócica. En Asia y Europa, el ajo se emplea para aliviar el resfriado común, tos, asma, fiebre y las heridas. El aceite de ajo también se ha empleado para tratar el dolor a causa de infecciones del oído. En África, se ha utilizado para tratar una gran cantidad de infecciones, incluidas la tuberculosis, enfermedades de transmisión sexual, infecciones del tracto respiratorio y las heridas.

Se ha notificado que el ajo exhibe una actividad antiviral en contra de infecciones virales humanas, vegetales y animales.

A pesar de que el ajo se ha empleado desde tiempos antiguos con fines medicinales, la investigación de sus componentes activos inició recientemente. Sus compuestos organosulfurados son los principales constituyentes bioactivos y por lo tanto también son los responsables de su olor acre. Más de treinta compuestos que contienen azufre pertenecen a dos clases químicas principales, L- cisteína sulfóxidos y γ - glutamil - L - péptidos de cisteína, los cuales se encuentran presentes en su constitución. Aliina (S-alil-L- cisteína sulfóxido) es el compuesto de azufre mayor concentración presente en el ajo seco y fresco (10-30 mg/g). La aliina se puede transformar rápidamente en alicina (tiosulfonato de dialilo) mediante las enzimas alinasa al triturar, picar o masticar ajo fresco. La alicina de tal forma es muy inestable y puede tener la capacidad de entrar en descomposición *in vitro* mediante otros compuestos organosulfurados, los cuales incluyen al sulfuro de dialilo,

disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo y vinilditiínas. La alicina tiene la capacidad de poder interactuar con tioles celulares como el glutatión y L-cisteína *in vivo* y de esta manera formar S-alil-mercapto-glutathion y S-alil-mercaptocisteína respectivamente. Estos compuestos podrían ser los responsables de las transformaciones estructurales perjudiciales dentro de las proteínas de los patógenos.

El ajo también presenta componentes que no son azufre, como lectinas, flavonoides (kaempferol, quercetina y miricetina), polisacáridos (fructanos), esteroides, saponinas, ácidos grasos (ácido láurico y linoleico), así como diferentes enzimas vitaminadas (A, B₁ y C), alicina, minerales (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Zn y Se) aminoácidos los cuales probablemente posean efectos aditivos o sinérgicos con los compuestos organosulfurados. Se mencionó a la alicina como uno de los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante, antiviral, antiinflamatorio, inmunomodulador y otras propiedades farmacológicas. Estudios preclínicos, ambos *in vitro* e *in vivo*, demostraron que los compuestos organosulfurados los cuales derivan de la alicina también presentan una actividad antiviral, potenciador del sistema inmunitario y otras actividades terapéuticas.⁶⁷

Además de esto, los ensayos clínicos aleatorizados en distintas preparaciones comerciales de ajo, también mostraron que éste mismo juega un papel terapéutico de suma importancia en distintas infecciones virales, como el resfriado y la gripe, hepatitis inducida por virus, verrugas asociadas a virus, así como la actividad de mejora inmunológica en pacientes infectados por virus. Se ha informado que uno de los mecanismos propuestos de su actividad antiviral es la inhibición del ciclo celular viral, de esta manera, ayuda a la mejora de la respuesta inmune del huésped y la reducción del estrés celular. Sin embargo, no existe una revisión sistemática hasta la fecha que demuestre en detalle la actividad antiviral del ajo y sus compuestos organosulfurados en estudios preclínicos y clínicos.

En la actualidad, las terapias las cuales se basan en productos naturales, se encuentran generando una atención significativa esto debido a su alta eficacia antimicrobiana, así, como por no inducir resistencia a los medicamentos. Debido a esto, el ajo, algunos derivados del quitosano, varias especies y péptidos antimicrobianos son ejemplo de tales productos.⁵⁵

Allium sativum ha sido reconocido por su alta actividad antimicrobiana contra distintos tipos de virus, bacterias y hongos. Los compuestos organosulfurados presentes en el ajo son los responsables de su actividad antimicrobiana.

Se ha identificado que el principal componente, la alicina, puede ejercer su actividad antimicrobiana mediante múltiples mecanismos. Los distintos agentes antimicrobianos que actúan a través de estos mecanismos tienen la capacidad de inducir poca o nula resistencia a los microorganismos. Los mecanismos propuestos para la actividad antimicrobiana de la alicina incluyen: 1) capacidad de permeabilidad de la membrana y capacidad para lisis de la estructura celular. 2) capacidad de alterar la expresión génica de microorganismos. 3) reactividad con enzimas que contienen tiol, lo que induce el estrés oxidante.⁵⁶

La matriz extracelular que libera y rodea a todas las bacterias, es la principal responsable de la resistencia de la biopelícula hacia los antibióticos. La mayoría de los estudios mencionan que las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de la biopelícula, así como sus interacciones eléctricas y su compatibilidad de carga en las matrices terapéuticas y en la misma biopelícula, influyen en el resultado de su tratamiento. La matriz extracelular es diferente para distintos tipos de biopelículas, y por lo tanto, requiere del uso de distintos agentes antimicrobianos, los cuales, son compatibles con la capacidad de penetración en las biopelículas específicas. Además de que un agente antimicrobiano tiene la capacidad de penetrar una matriz de biopelícula, este puede no ser eficaz para destruir al microorganismo. De manera similar, es posible que un agente con buena actividad en contra de un microorganismo en específico no pueda penetrar en la totalidad de la matriz de la biopelícula. Algunos antibióticos capaces de penetrar en biopelículas no eliminan el 100% de las bacterias de las biopelículas. De esta forma, un sistema de administración que tenga la capacidad de penetrar en la mayoría o en todas las biopelículas y al mismo tiempo administrar cualquiera de una gran cantidad de agentes antimicrobianos de amplio espectro o de espectro reducido al organismo sería extremadamente beneficioso el cual constaría con una amplia aplicabilidad para múltiples indicaciones finales.²⁵

Estudios previos han informado acerca del efecto de varias preparaciones de ajo, ya sea fresco, transgénico, o componentes individuales en las biopelículas bacterianas.

La alicina altera la formación de biopelículas mediante la inhibición de la síntesis de adhesina intercelular en polisacáridos, la cual forma parte de las varias adhesinas bacterianas necesarias para la formación de biopelículas en *S. epidermidis*. En *P. aeruginosa*, la alicina disminuyó drásticamente la adhesión bacteriana y la secreción de exopolisacáridos bacterianos, además redujo de manera significativa la expresión de distintos factores de virulencia como la exotoxina A, la elastasa, los ramnolípidos y otras adhesinas implicadas en la detección del quorum sensing.

Otro inhibidor del quorum sensing derivado de la alicina, se desempeña mediante la regulación a la baja en la expresión génica de *rhl* en *P. aeruginosa*, contribuyendo en la síntesis de ramnolípidos bacterianos, de esta manera, se lleva a cabo la inhibición la lisis de leucocitos polimorfonucleares, incrementando así la inmunidad del huésped en contra de las infecciones bacterianas. Los estudios transcriptómicos han demostrado una relación directa entre la concentración del ajo y el silenciamiento del gen QS en *P. aeruginosa*.¹⁸

Entre los genes regulados significativamente a la baja por el ajo se encontraban factores de virulencia importantes regulados por QS, como la quitinasa, la lectina citotóxica, la proteína de unión a quitina y otros. Además, el ajo, también reguló a la baja la expresión de pequeñas moléculas de RNA reguladoras en *P. aeruginosa* y *S. aureus*, la represión de RNAIII dirigió a la baja la expresión de factores de virulencia como lipasas, hemolisinas y varias serinas y cisteínas proteasas. Por lo tanto, una biopelícula con deficiencia en QS podría ser mas susceptible a los tratamientos anti-biopelícula.⁵⁷

Con base en lo anteriormente mencionado, el objetivo de nuestro estudio experimental es llevar a cabo la evaluación de uno de los principales compuestos organosulfurados derivados del *Allium sativum* al interactuar con una biopelícula dental madura. Estudios experimentales *in vitro* han demostrado la susceptibilidad

de especies planctónicas ante la actividad del dialil disulfuro, pero aun no se ha evidenciado la actividad de este compuesto contra biopelícula dental madura de manera *in situ*, es por ello que la relevancia de nuestro estudio nos permitirá evaluar las condiciones ambientales en las cuales crece una biopelícula y madura, para posteriormente evaluar su actividad al interactuar con los compuestos a base de dialil disulfuro.

ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales (AE) son compuestos orgánicos con diferentes constituyentes los cuales son extraídos de vegetales por procesos específicos. La fórmula actual menciona cuatro ingredientes activos: Eucalipto 0.092%, Mentol 0.042%, MetilSalicilato 0.060%, Timol 0.064%. Los AE han demostrado ser eficientes en el control de la gingivitis y el biofilm supragingival, los cuales son seguros para su empleo por parte de los pacientes. Los AE presentan la capacidad de lisar la pared celular de diferentes microorganismos y de esta forma llevar a la supresión de su actividad enzimática. Además pueden inhibir las endotoxinas de patógenos Gram-negativos. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad de los AE para penetrar en la biopelícula dental y ejercer su efecto bactericida.⁶⁹

Los compuestos fenólicos presentan actividad inhibidora y antiinflamatoria de la producción de prostaglandinas, los cuales se comportan como recolectores de los radicales libres de oxígeno alterando la actividad de los leucocitos. Estudios con células animales demuestran que los compuestos fenólicos normalmente utilizados en estas formulaciones químicas (timol, mentol, eucaliptol), establecieron que existe inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos y de la síntesis de superóxidos por parte de dichas células, así como la eliminación o secuestro de los radicales libres liberados e inhibición de prostaglandinas. Estos compuestos aromáticos contienen un grupo hidroxilo libre el cual es el encargado de la respuesta antiinflamatoria.⁷⁰

MICROSCOPIA CONFOCAL

Dentro de los principales estudios de observación la microscopía confocal permite la visualización de muestras con marcaje fluorescente, realizando cortes ópticos de las mismas y permitiendo su reconstrucción tridimensional. Una de las características principales de este estudio es la detección y recolección de los haces de luz emitidos por distintas moléculas fluorescentes las cuales se sitúan en un mismo plano focal dentro del espacio tridimensional. Esto es posible debido, por una parte, a la fuente de iluminación la cual es emitida por una luz láser en la que el haz monocromático permanece perfectamente lineal al propagarse. Esta luz permite la iluminación de las muestras con una intensidad estable y muy elevada. Esta distribución permite obtener resoluciones subcelulares microscópicas. Desde un punto de vista técnico, los microscopios confocales actuales están equipados con una pieza llamada “diafragma de detección confocal “ o “pinhole”, la cual consiste en una pequeña abertura en el filtro detector de la luz, la cual limita el paso de aquella proveniente de los planos de la muestra que no están enfocados. De esta forma, solo se obtiene la información de la región enfocada, la cual se denomina “plano de imagen primario” o “plano focal”, y se deshecha el resto. Como resultado final se obtienen imágenes de mucho mejor calidad y nitidez, las cuales cuentan con la capacidad de realizar cortes virtuales de cada una de las muestras analizadas. Esta microscopía, facilita el estudio tridimensional de las muestras donde se llevan a cabo imágenes de profundidad, y en determinados materiales permite la obtención de imágenes de superficie mediante flexión. La microscopía confocal fácilmente se aplica en el estudio de muestras *in vivo* en el transcurso de una secuencia temporal o para la distribución de distintos marcadores en una región en específico.⁶⁵

Una de sus aplicaciones principales es dentro de las áreas de estudio de la medicina, biología molecular, biología celular, fisiología, biología vegetal, ciencia de materiales, microbiología, histología, bioquímica, biomedicina, inmunología y anatomía.

Los distintos tipos de ensayos los cuales se pueden realizar a través de esta técnica microscópica se basan generalmente en análisis tridimensionales de muestras

biológicas: inmunofluorescencia de tejidos, tejidos, organismos completos de cierto tamaño, biofilms, etc. con la posibilidad de trabajar las secciones ópticas tanto de manera horizontal (xyz) como de forma verticalmente (xzy).⁶⁶

JUSTIFICACIÓN

Como se ha descrito anteriormente, los principales microorganismos asociados con una forma de biopelícula se encuentran relacionados a infecciones polimicrobianas persistentes que pueden afectar el organismo humano de una forma indiscriminada. La asociación de las biopelículas adheridas a dispositivos médicos implantables como lo son los marcapasos o implantes dentales, limitan su tiempo de permanencia dentro del cuerpo humano debido a la colonización de estos microorganismos y la subsecuente exéresis de los mismos dispositivos. El incremento en la resistencia presente en los microorganismos hacia las terapias farmacológicas convencionales, nos llevan a buscar alternativas eficaces para contrarrestar el crecimiento y maduración de las diferentes biopelículas asociadas. Como en los estudios experimentales descritos *in vitro* demuestran, la actividad del compuesto a base de dialil disulfuro no solamente presenta actividad antimicrobiana contra especies planctónicas, si no también hacia microorganismos asociados en calidad de biopelícula. Los estudios revelan que la ausencia de conocimiento referente al crecimiento de una biopelícula dental de manera *in situ*, conllevan a una problemática para determinar la actividad de los compuestos anteriormente descritos, es por ello que en nuestro estudio, nos enfocamos en determinar la actividad de los compuestos a base de dialil disulfuro con una biopelícula dental madura de forma *in situ*, con la finalidad de evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos derivados del *Allium sativum* mediante un protocolo experimental y la subsecuente determinación de los resultados obtenidos mediante un análisis de viabilidad celular.

OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la evaluación *in situ* del cambio en la estructura de la biopelícula dental con la interacción de compuestos antimicrobianos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Desarrollar modelos de biopelículas de manera *in situ* en un lapso de tiempo de 48 horas para su completa maduración en pacientes.
- 2.- Analizar la interacción de los compuestos dialil disulfuro y aceites esenciales con la biopelícula dental con el empleo de microscopía confocal.

HIPÓTESIS

Los compuestos organosulfurados a base de dialil disulfuro llevarán a cabo su actividad bactericida sobre una biopelícula dental madura, el cual, será análogo al obtenido con el grupo control positivo de aceites esenciales.

II. MÉTODOS

El número total de pacientes participantes se acordó en un total de 10 individuos, de los cuales los criterios de inclusión de los mismos fueron los siguientes:

- Individuos sistémicamente sanos
- Sexo masculino o femenino
- Edad mínima 18 años
- Cavidad bucal en salud, con valoración previa del estado de salud periodontal
- Higiene bucal adecuada a razón de 3 veces al día
- Dentición permanente completa
- Sin ingesta de ningún tipo de medicamento en las últimas 2 semanas

Cada uno de los individuos en cuestión formaron parte de los tres grupos pertenecientes al protocolo de experimentación (grupo experimental, grupo control positivo y grupo control negativo) de manera aleatorizada, es decir, la biopelícula dental crecida de un mismo individuo se sometió a la interacción con las soluciones de aceites esenciales, dialil disulfuro y agua bidestilada para su posterior evaluación.

El paciente en cuestión fue previamente informado del protocolo a seguir, para lo cual firmó un consentimiento avalado por el comité de ética de la Universidad Nacional Autónoma de México: CIE/1111/08/2020.

DISPOSITIVO REMOVIBLE

En el transcurso del programa de investigación, nos dimos a la tarea de llevar a cabo el estudio piloto, para esto realizamos el diseño del dispositivo removible, en el cual, las superficies de hidroxiapatita se encontraron adheridas de manera provisional, con la finalidad de llevar a cabo el cultivo de las diferentes especies bacterianas para la formación de la biopelícula dental bajo las condiciones de crecimiento normales, las cuales son requeridas en la cavidad bucal como lo es la saliva y el líquido crevicular. Una vez desarrollada la biopelícula sobre estas

superficies de hidroxiapatita, recuperamos el dispositivo de la boca del paciente para llevar a cabo la interacción de los compuestos organosulfurados como lo es el dialil disulfuro, así como los grupos control los cuales fueron a base de aceites esenciales obtenidos de un colutorio comercial y agua bidestilada estéril, las cuales entraron en contacto directo durante el protocolo experimental con la biopelícula crecida en las superficies de hidroxiapatita.

La elaboración del dispositivo removible en las cuales se encontraron adheridas de manera provisional las superficies de hidroxiapatita contó con las siguientes condiciones:

- Fácil manipulación para el paciente
- Material semirígido y no deformable
- Biocompatible con los tejidos periodontales y de la cavidad bucal
- Bajo costo

El material de elección para llevar a cabo el dispositivo removible fue a base de acetato de polímero termoformable no. 40, con un espesor de 1mm. La obtención del negativo referente a la arcada dentaria del paciente en cuestion, se obtuvo mediante materiales de impresión a base de hidrocoloides irreversibles como lo es el alginato de sodio dental Kromopan, Zeyco® utilizamos portaimpresiones perforados previamente seleccionados para el paciente en cuestion.

Posterior a la obtención del negativo de la arcada dentaria, recuperamos el positivo para lo cual utilizamos sulfato de calcio hidratado tipo 3 mediante la técnica de vaciado dental, con las proporciones dadas previamente por el fabricante.

Una vez obtenido el positivo, se procedió al fundido del acetato de acrílico utilizando un aparato de fundición y aspiración Vacuum®, mediante la técnica de aspiración y vacío. Posterior a esto se llevó a cabo la adaptación del dispositivo en la arcada dental del paciente mediante fresones y pulidores de acrílico, el cual se recortó para que el margen del acetato se mantuviera sin contacto con el margen gingival, de manera que solo cubriera la superficie vestibular, oclusal y palatina de los dientes.

Una vez obtenido el dispositivo removible, se realizaron perforaciones de retención en el área de los O.D. 15,16,17, en donde en cada uno de los O.D. se procedió a la colocación de las superficies de hidroxiapatita, para esto utilizamos silicones a base de polimetil siloxano tipo C, Speedex®, los cuales nos sirvieron como nicho de retención para llevar a cabo la adhesión de cada una de las 3 superficies de hidroxiapatita de 4mm. de diámetro y 1 mm. de espesor.

Se le entregó el dispositivo al voluntario en cuestion, el cual recibió y posteriormente se procedió a revisar clínicamente el ajuste del mismo para evitar incomodidad durante el tiempo de uso.

Posteriormente a esto se procedió a dar las explicaciones de uso y cuidado que el paciente debía de seguir, comprometiéndose el mismo a seguirlas apegándose a cada una de ellas, las cuales fueron las siguientes:

- Utilizar el dispositivo a partir de ese momento alcanzando un límite de 48 horas, durante el cual, el paciente debió de hacer uso del mismo en todo momento, exceptuando los periodos de ingesta de alimento y de higiene bucal
- Evitar la manipulación excesiva del mismo, sobre todo, refiriéndonos a las superficies de hidroxiapatita en las cuales se llevará el crecimiento de la biopelícula dental.
- Higiene bucal regular, en el cual, el uso de auxiliares de higiene no deben de ser empleados, como lo es las pastas y colutorios dentales, para esto, la higiene solamente se realizó utilizando cepillo dental regular y agua corriente.

Una vez recibidas las indicaciones, el voluntario se sometió al uso del dispositivo removible, el cual tuvo que emplearse por 48 horas continuas debido a que la literatura menciona que este es el tiempo adecuado en el cual se logrará una completa formación y maduración de la biopelícula dental, y solo pudo ser retirado de boca al ingerir alimentos y realizar higiene dental, en total no debió permanecer el dispositivo oclusal por mas de 60 minutos fuera de boca. Mientras el dispositivo no se encontró

en uso, debió estar envuelto en una gasa húmeda y sobre una superficie plana y limpia. Se monitorizó al paciente para recordar las indicaciones mediante contacto directo continuo de los examinadores.

Al completarse las 48 horas de uso, se citó nuevamente al individuo y se le solicitó regresar a los examinadores el dispositivo. Hasta ese momento se concluyó la participación en el estudio del paciente.

DISCOS DE HIDROXIAPATITA Y CONCENTRACIÓN DIALIL DISULFURO

El crecimiento de la biopelícula bacteriana para su estudio *in vitro* se llevó a cabo mediante el empleo de discos de hidroxiapatita los cuales fueron obtenidos de manera comercial mediante el laboratorio.

El proceso de fabricación de estos discos es por prensado y sinterizado. Estos discos generalmente tienen diferentes porosidades aparentes, con la finalidad de que sean dopados con fármacos para ser utilizados como sistemas de liberación. La relación entre las propiedades mecánicas de estos discos y la porosidad aparente es de suma importancia para poder ser aplicados como injertos, prótesis o sistemas de liberación controlada en el organismo humano.

Por último, el extracto del compuesto organosulfurado a base de dialil disulfuro fue adquirido de manera comercial en un laboratorio especializado, en el cual la concentración obtenida fue equivalente a 80 $\mu\text{g/ml}$, la cual corresponde con la concentración mínima inhibitoria mencionada en la literatura, debido a que el compuesto de dialil disulfuro es un tioéter lipofílico derivado de la alicina oxidada del género *Allium sativum*, el cual pertenece a la familia *Rutaceae*. El *Allium sativum* se compone de varios metabolitos biológicamente activos como aliina, alinasa, alicina, S-alicisteína, dialil disulfuro y alilmetiltrisulfuro.

ANÁLISIS VIABILIDAD CELULAR LIVE AND DEAD

El kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD es un ensayo de viabilidad celular fluorescente de dos colores el cual se basa en la identificación simultánea de células vivas y muertas. Las células vivas se encuentran etiquetadas con colorantes de calceína los cuales se encargan de la emisión de una fluorescencia verde, mientras que las células muertas se encuentran etiquetadas con colorantes rojo oscuro SYTOX, en donde estos emiten una fluorescencia roja. Ambos colorantes presentan la capacidad de multiplexarse con otros fluoróforos los cuales pueden ser naranja/rojo o con otros conjuntos de filtros compatibles.

Las ventajas de este ensayo son las siguientes:

- Determina la viabilidad celular con fluorescentes de dos colores
- Detecta las células vivas con un conjunto de filtros GFP/FITC y células muertas con un conjunto de filtros rojo oscuro/CY5
- Multiplexable con fluoróforos naranjas/rojos como RFP, mCherry, Mitotracker rojo/naranja, LysoTracker Red, TMRM.

Las células obtienen su diferenciación de acuerdo a la presencia de una actividad esterasa intracelular ubicua, en donde esta es determinada debido a la conversión enzimática de la calceína AM con fluorescencia limitada, con la capacidad específica de penetración celular a la calceína intensamente fluorescente. La calceína se conserva bien dentro de las células vivas, lo cual da como resultado una intensa fluorescencia verde uniforme en las células vivas (ex/em~495/~525nm). La calceína puede detectarse con un conjunto de filtros FITC/GFP tradicionales. El colorante rojo oscuro SYTOX atraviesa a las células con membranas dañadas y aumenta su fluorescencia múltiples ocasiones al unirse al ADN. La fluorescencia de núcleos con membrana plasmática comprometida o muerta es brillante y puede ser detectable con un conjunto de filtros CY5/rojo oscuro (ex/em máxima:660/682 nm). El kit es conveniente para su empleo con microscopios de fluorescencia o escáneres de placa multipocillo de fluorescencia de análisis de alto contenido (HCA) y es

fácilmente adaptable en función con otros sistemas de detección de fluorescencia. Los principios de ensayos son generales y aplicables en la mayor parte de los tipos de células eucariontas en las cuales se incluyen las células adherente y no adherentes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las mediciones de rugosidad media y viabilidad bacteriana entre las diferentes superficies experimentales se presentan como la media (ME)± el error estándar de la media (EEM). Los análisis para determinar las diferencias en la cantidad de bacterias adheridas entre cada una de las superficies analizadas se llevaron a cabo mediante la prueba t- de Student y las diferencias significativas se determinaron utilizando la modificación de Bonferroni de la prueba t de Student.

PROTOCOLO PREPARACIÓN DE SUPERFICIES

Posterior al uso continuo del dispositivo por parte de los pacientes participantes durante el lapso de 48 horas, los individuos regresaron con los experimentadores para la obtención de la biopelícula crecida *in vitro*.

Utilizamos guantes de látex para proceder al retiro del dispositivo de la boca del paciente, tuvimos cuidado de no manipular las superficies de los discos de hidroxiapatita en todo momento. Después de esto, procedimos a recuperar cada uno de los discos de hidroxiapatita del dispositivo, utilizamos pinzas de curación, teniendo cuidado de no dañar las superficies de los mismos. Posteriormente, se procedió a colocar los discos de hidroxiapatita en las cajas de 24 pozos, en este punto fue importante rotular con marcador indeleble cada uno de los pozos en donde se colocó cada uno de los discos con las soluciones previamente descritas: agua bidestilada estéril (H₂O), aceites esenciales (EO) y dialil disulfuro (DDS), con la muesca hacia la parte de abajo. El siguiente paso fue colocar 2 ml. de cada una de las soluciones para lo cual empleamos micropipetas previamente calibradas en cada uno de los pozos, conteniendo los discos de hidroxiapatita en el siguiente orden: primera muestra EO, Segunda muestra DDS 80 $\mu\text{g/ml}$. y por último el tercer disco control H₂O. Procedimos a la simulación de las soluciones en contacto con las superficies de los discos de hidroxiapatita utilizando un shaker durante 5 min. A una velocidad de rotación de 200rpm. Posterior a estos iniciamos con la recuperación de los discos los cuales se colocaron en portaobjetos de vidrio en una cámara de fluorescencia. Se llevó a cabo la elaboración de la mezcla del kit Live & Dead utilizando proporciones 5 μL en combinación con cada uno de los reactivos en proporción 1:1. Se procedió a la colocación de los reactivos del kit Live & Dead sobre los discos de hidroxiapatita para lo cual empleamos micropipetas previamente calibradas, de manera que cada una de las superficies de los discos de hidroxiapatita se encontró en total contacto con los reactivos durante un tiempo establecido de 20 min. Se procedió al lavado de las muestras mediante agua bidestilada durante 20 segundos. Posteriormente se llevó a cabo la colocación de los discos preparados en recipientes plásticos, se hidrataron previamente

empleando agua bidestilada. Para finalizar, llevamos a cabo la visualización de las superficies de los discos de hidroxiapatita las cuales fueron analizadas con un microscopio confocal (Nikon) con una longitud de onda de excitación de 490 nm y una lectura de emisión de 522nm para SYTO9 y 635nm para yoduro de propidio con la finalidad de recopilar las imágenes referentes a cada uno de los controles, así como la actividad del compuesto DDS y evaluar su actividad en la biopelícula dental utilizando el kit Live & Dead® BacLight™ (Invitrogen).

III. RESULTADOS

Análisis de la biopelícula con microscopía confocal

El análisis de la biopelícula con microscopía confocal se realizó a través del software integrado al microscopio en el cual se obtuvieron las unidades de intensidad arbitrarias (U.I.A.) para cada uno de los canales de emisión (rojo, verde, rojo/verde) Los análisis se realizaron por triplicado para cada una de las superficies experimentales pertenecientes a cada grupo, en cada uno de los participantes.

Los resultados obtenidos se clasificaron de acuerdo con el canal de viabilidad/letalidad al cual perteneció cada una de las superficies, las imágenes fueron obtenidas de 10 voluntarios diferentes, en donde se llevó a cabo el análisis mediante microscopia confocal por triplicado de cada una de las muestras. Cada muestra fue procesada en el mismo tiempo de trabajo bajo las condiciones previamente descritas. Se identificó el canal de viabilidad celular de la biopelícula en el espectro verde, el canal de letalidad en el espectro rojo y el empalme de las mismas imágenes de comparación en el espectro verde/rojo, para cada uno de los grupos (DDS, EO y control). (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3). En el análisis microscópico se detectaron los siguientes valores para el grupo control, en el canal de letalidad celular los rangos establecidos fueron los siguientes: mayor 23.47 U.I.A; menor 7.49 U.I.A. Canal de viabilidad celular del grupo control: mayor 38.48 U.I.A; menor 11.66 U.I.A. Grupo DDS, para el canal de letalidad celular los rangos establecidos fueron los siguientes: mayor 50.87 U.I.A; menor 4.06 U.I.A. Canal de viabilidad celular del grupo DDS: mayor 55.03 U.I.A; menor 2.40 U.I.A. Grupo EO, para el canal de letalidad celular, los rangos establecidos fueron los siguientes: mayor 35.17 U.I.A; menor 3.14 U.I.A. Canal de viabilidad celular del grupo EO: mayor 38.48 U.I.A; menor 1.57 U.I.A. Tabla 1 y 2. En el voluntario 7, los datos establecidos en el grupo control no fueron registrados y se denominan como N/A.

Las micrografías obtenidas mediante el microscopio confocal laser de barrido a 20x mostraron imágenes por triplicado de cada muestra asociadas a cada voluntario, las

cuales fueron organizadas en 3 canales: viabilidad celular (canal verde), letalidad celular (canal rojo) e imágenes de empalme de ambos canales descritos anteriormente (verde/rojo).

No. Voluntario	Control	Control	DDS	DDS	EO	EO
	Letalidad	Viabilidad	Letalidad	Viabilidad	Letalidad	Viabilidad
Voluntario 1	9.8657	11.6640	9.5914	9.0619	31.5462	30.4720
Voluntario 2	13.4750	30.5601	28.2084	4.5797	31.0459	31.6324
Voluntario 3	7.4905	13.0541	4.0637	2.4061	15.6832	23.7041
Voluntario 4	9.6717	38.4878	16.3270	40.442	24.8469	38.4806
Voluntario 5	11.9306	25.0263	9.6232	36.7740	16.9121	15.7766
Voluntario 6	23.4796	31.2368	50.8770	55.0339	35.1730	3.8413
Voluntario 7	N/A	N/A	9.1051	19.9585	3.1422	14.5161
Voluntario 8	12.5669	27.2207	12.8250	23.9601	10.7183	1.9510
Voluntario 9	17.8587	27.7297	12.5865	17.95	26.8326	7.1099
Voluntario 10	12.5669	27.2207	26.2088	26.6392	10.2648	1.5790

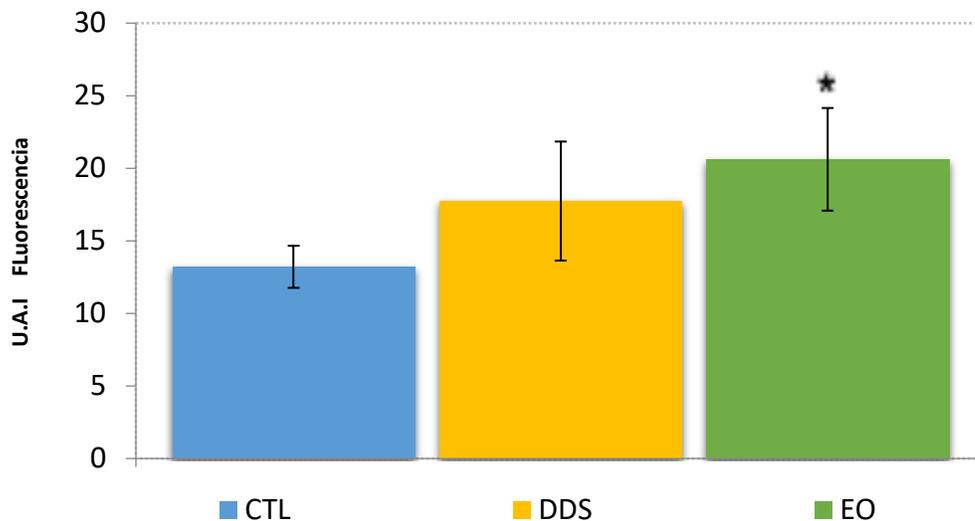
Tabla 1. Promedios de U.I de cada voluntario para cada canal perteneciente a cada grupo

Posteriormente se llevó a cabo el promedio total perteneciente a cada uno de los grupos en los diferentes canales de letalidad y viabilidad para obtener el error estándar de cada uno de ellos, los cuales se aprecian en la tabla 2.

	Control	Control	DDS	DDS	EO	EO
	Letalidad	Viabilidad	Letalidad	Viabilidad	Letalidad	Viabilidad
Promedio Total	13.2118	25.8000	17.7416	23.6805	20.6165	16.9063
EEM	1.4474	2.3602	4.1145	4.7369	3.5356	4.4529

Tabla 2. Promedio y el error estandar muestral de los datos previamente obtenidos en la tabla 1

El primer grupo de imágenes referente a la letalidad celular presentó una disminución en el número de células bacterianas muertas el cual corresponde al grupo control, el cual fue de 13.21 ± 1.44 U.I.A. Fig. 1-A. La imagen correspondiente al grupo DDS presenta un mayor número de células bacterianas muertas el cual fue de 17.74 ± 4.11 U.I.A. Fig. 1-B. La imagen correspondiente al grupo EO presenta un mayor incremento de células bacterianas muertas el cual fue de 20.61 ± 3.53 U.I.A.



Graf. 1 Se muestra el efecto antibacteriano a través de la letalidad celular de cada uno de los grupos al entrar en contacto con la biopelícula en relación a las unidades arbitrarias de fluorescencia (U.I.A.). CTL vs DDS $p > 0.05$, CTL vs EO $p > 0.05$, *EO vs DDS $p < 0.05$.

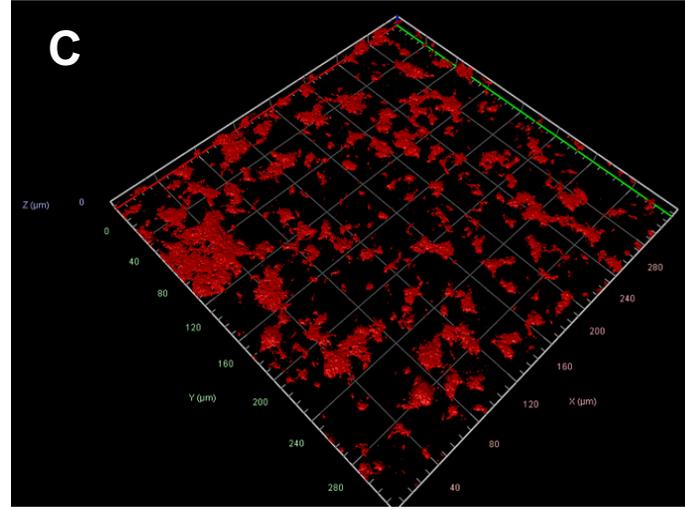
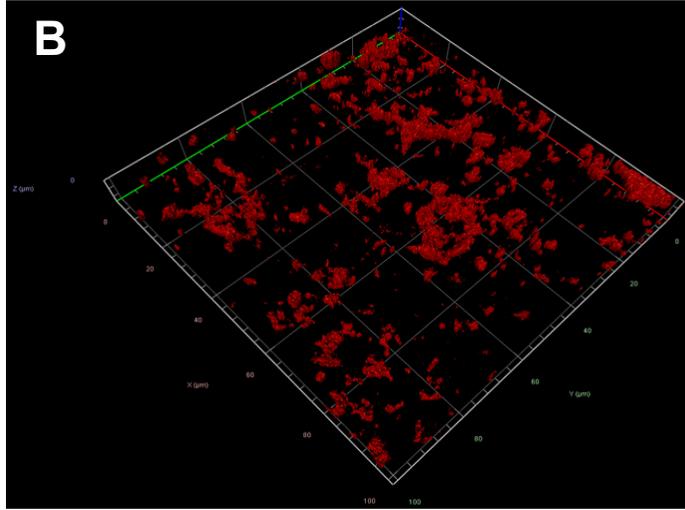
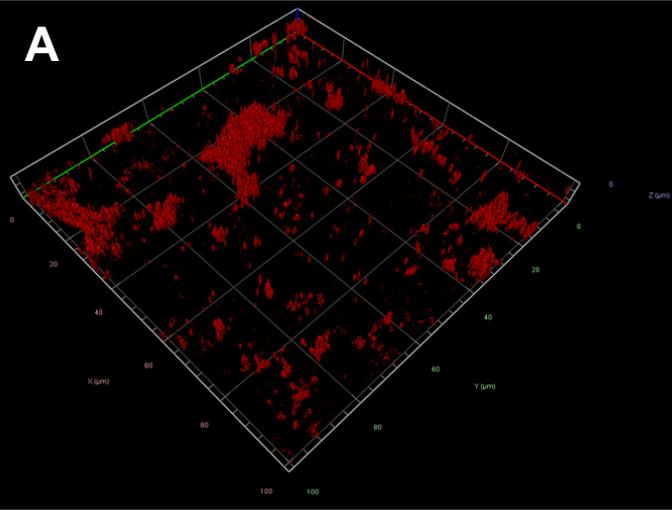
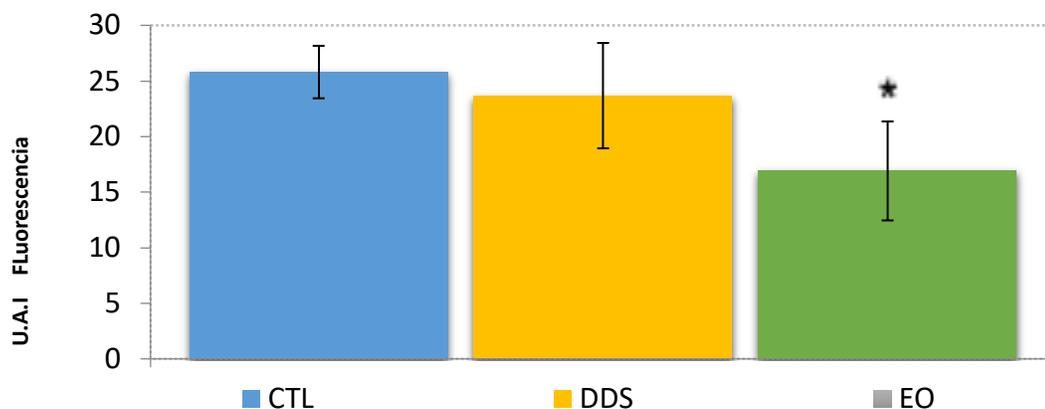


Fig. 1 A-C. Micrografía cualitativa por microscopía confocal laser de barrido a 20X a las 48 horas de formación de la biopelícula bacteriana en donde se aprecia letalidad celular en grupo control (A), DDS (B) y EO (C)

El canal referente a la viabilidad, el grupo control presentó una mayor presencia de células viables asociadas en clusters y empalizada el cual fue de 25.80 ± 2.36 U.I.A. Fig. 2-A. La imagen correspondiente al grupo DDS presentó una menor cantidad de células viables en relación al grupo control el cual fue de 23.68 ± 4.73 U.I.A. Fig. 2-B, mientras que la imagen correspondiente al grupo EO presentó la menor cantidad de células viables asociadas en coalición el cual fue de 16.90 ± 4.45 U.I.A. Fig. 2-C. El último canal presentó el traslape de ambas imágenes previamente descritas asociadas a cada grupo. Fig. 3 A-C.

Finalmente, se realizó mediante el empleo del programa de microscopía confocal, cortes sagitales de la biopelícula, en donde se pudo identificar la afectación de las diferentes capas de formación de superficie con cada uno de los grupos. Se pudo observar que tanto en el grupo EO como en el grupo DDS no solamente se afectaron capas superficiales si no también capas profundas e intermedias de la biopelícula, esto nos permite identificar el efecto de ambos compuestos en microorganismos colonizadores primarios formadores de la misma, así como microorganismos de enlace hacia la biopelícula madura. Fig. 4 A-C. Se estableció el análisis de rugosidad superficial por triplicado mínimamente de los discos de hidroxiapatita, estos fueron sometidos previamente a una fase de esterilización mediante calor húmedo (autoclave) a 15 PSI, a 120°C durante 15 min. para posteriormente visualizarlos mediante el microscopio confocal por medio de la técnica de reflexión obtenida mediante la emisión de láser 488nm. Fig. 5 A-C.



Graf. 2 Se muestra la viabilidad celular de cada uno de los grupos al entrar en contacto con la biopelícula oral en relación a las unidades arbitrarias de fluorescencia (U.I.A.). EO vs DDS $p > 0.05$, *CTL vs EO $p < 0.05$, CTL vs DDS $p > 0.05$

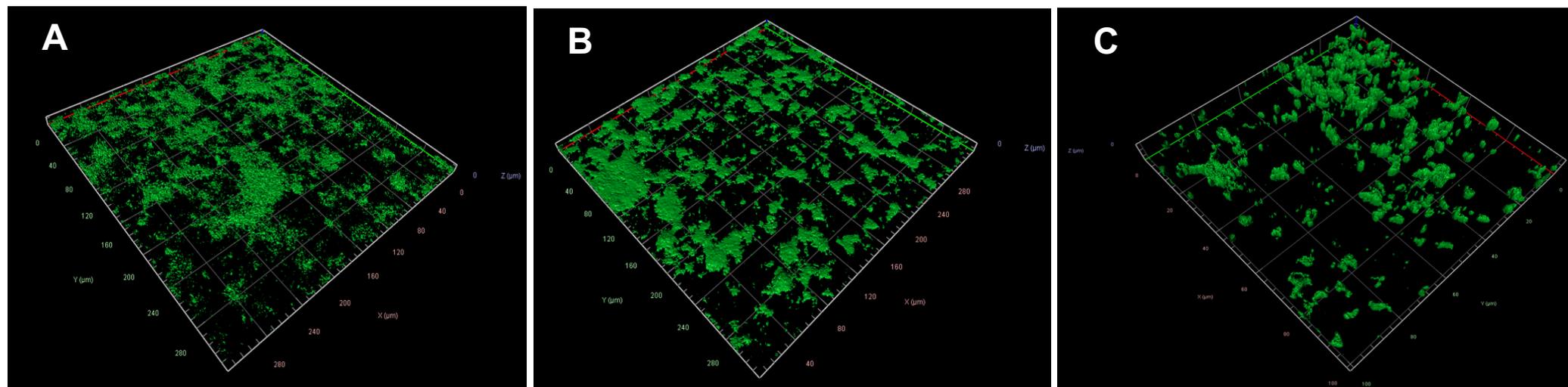


Fig. 2 A-C. Micrografía cualitativa por microscopía confocal laser de barrido a 20X a las 48 horas de formación de la biopelícula bacteriana en donde se aprecia viabilidad celular en grupo control (A), DDS (B) y EO (C)

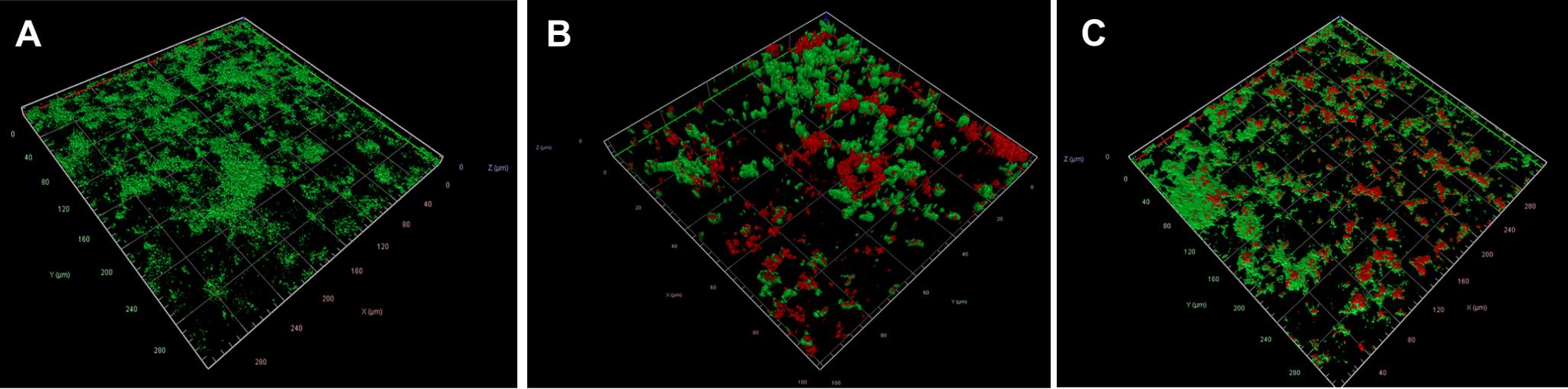


Fig. 3 A-C. Microfotografía cualitativa por microscopía confocal laser de barrido a 20X despues de 48 horas crecida la biopelícula en donde se aprecian imágenes translapadas (merge) obtenidas en viabilidad y letalidad celular en grupos control (A), DDS (B) y EO (C)

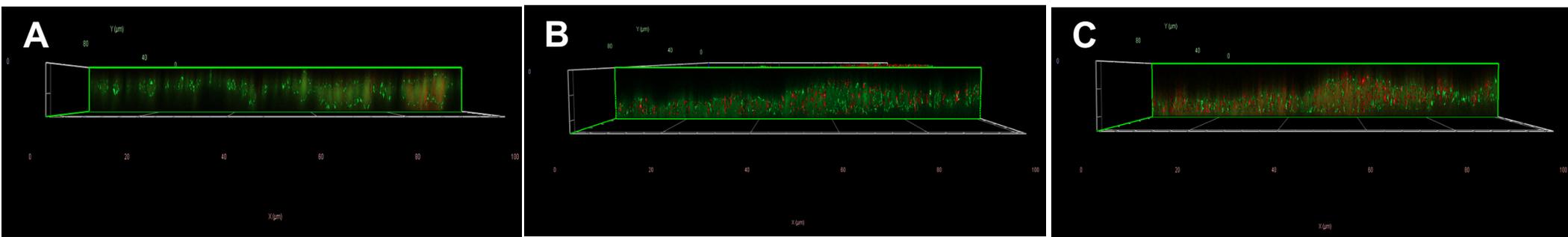


Fig. 4 A-C. Micrografía cualitativa por microscopía confocal laser de barrido a 20X a las 48 horas de formación de la biopelícula bacteriana en donde se aprecia interacción entre viabilidad y muerte celular en corte sagital de la biopelícula, grupo control (A), DDS (B) y EO (C)

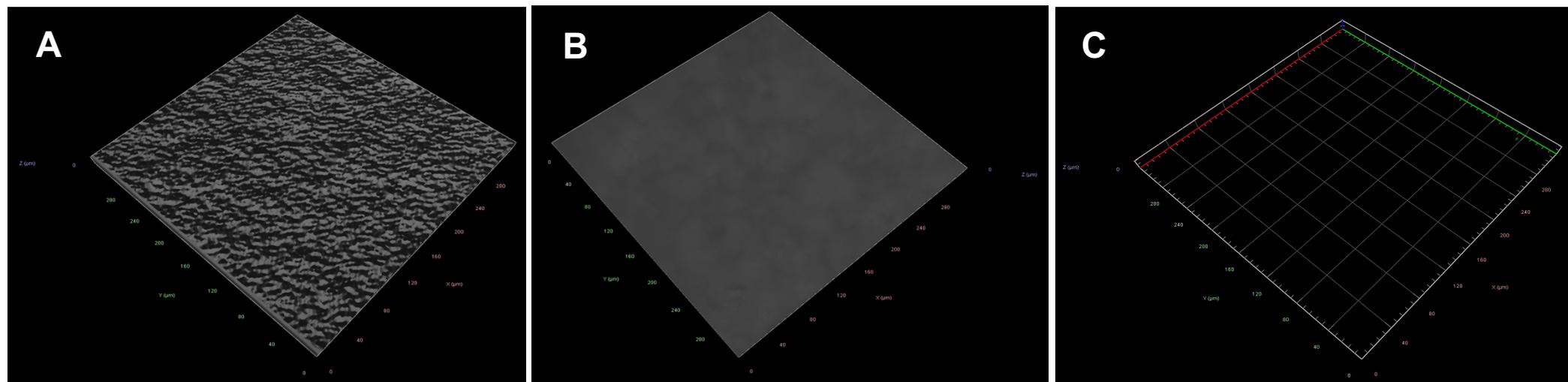


Fig. 5 A-C. Micrografía cualitativa por microscopía confocal laser de barrido a 20X en donde se aprecia disco de hidroxiapatita estéril y sin tinción fluorescente

El grosor de la biopelícula crecida *in vitro* en los discos de hidroxiapatita fue determinado mediante la recopilación de un ROI set mediante microscopía confocal, en donde se llevó a cabo el promedio de 10 imágenes previamente seleccionadas. Los parámetros necesarios para la medición del grosor de la biopelícula fueron los siguientes: pico más alto presentado en la cresta de mayor longitud y la base a cero de la misma imagen. Las mediciones de cada una de las 10 imágenes se presentan en la tabla 3. El análisis previamente descrito nos arrojó un promedio en el grosor de la biopelícula crecida *in vitro* de 94.73 μm . Fig. 8. El plot muestra de una de las biopelículas analizadas mediante microscopía confocal se aprecia en la Figura 6.

BP	Area	Mean	Min	Max	Angle	Lenght
1	3.961	68.816	0	255	-90	8.264
2	4.132	187.952	0	255	-90	98.425
3	4.404	211.834	8.306	255	-82.692	40.571
4	4.418	235.549	61.091	255	-57.417	215.627
5	3.217	165.201	0	255	-99.968	115.702
6	4.318	201.514	0	255	-51.876	88.655
7	4.261	224.699	0	255	-68.314	8.264
8	3.789	210.487	0	255	-53.29	40.571
9	4.461	127.255	0	255	-110.795	215.627
10	3.961	68.816	0	255	-90	115.702

Tabla 3. Análisis de longitud mediante microscopía confocal de las 10 biopelículas *in vitro*.

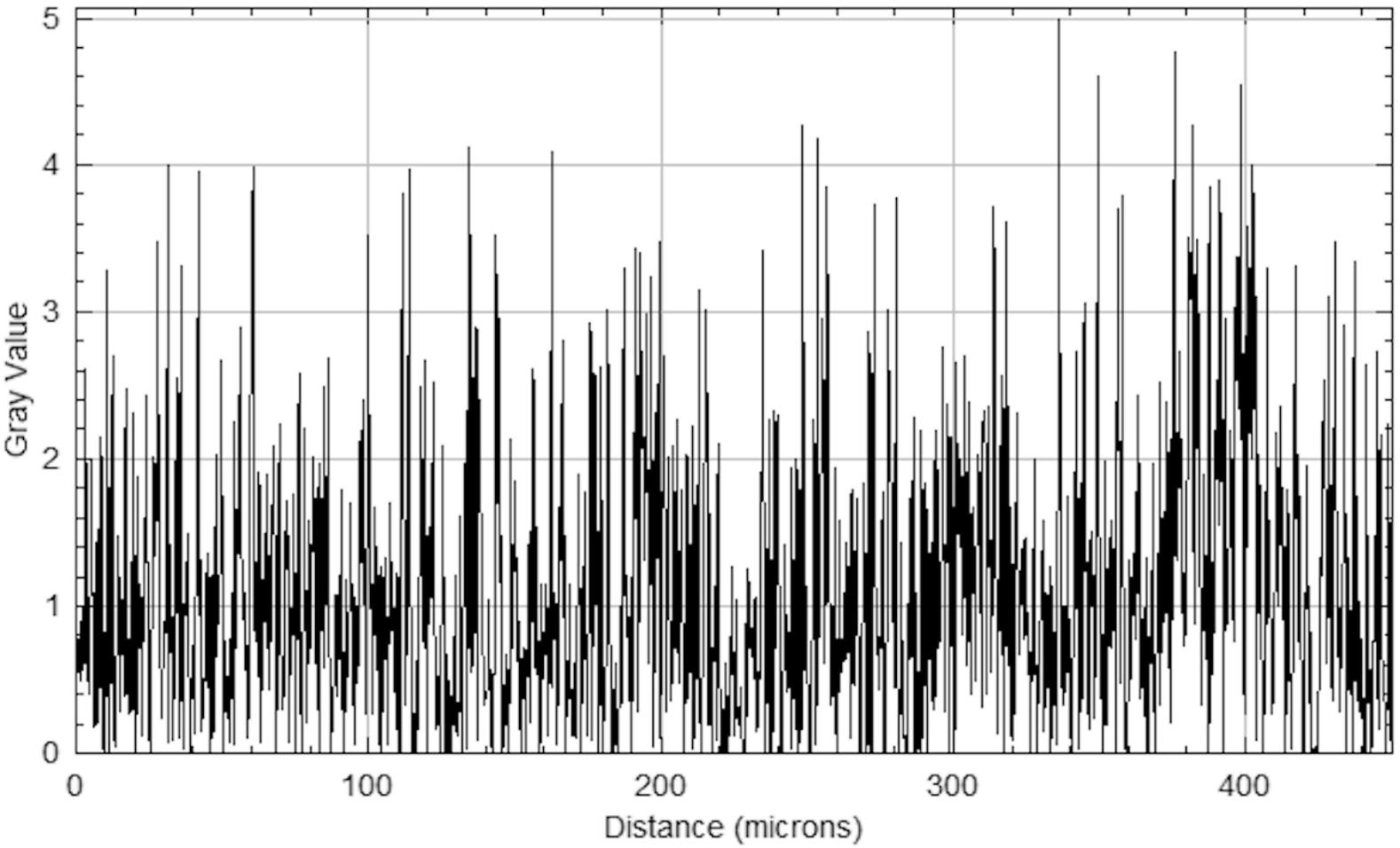


Fig. 6. Plot muestra mediante microscopía confocal en escala de grises para la determinación del grosor de la biopelícula *in vitro*

La evaluación de la rugosidad de las superficies de hidroxiapatita fue determinada mediante un análisis de microscopía confocal por medio de la recopilación de datos de un ROI set. Se analizó la distancia dentro de los diferentes valores de grises entre cada cresta, los cuales especifican los poros dentro de la superficie de hidroxiapatita (15), para posteriormente llevar a cabo las mediciones pertinentes dentro del software del microscopio confocal y obtener un promedio específico, el cual fue de $5.996 \mu\text{m}$. Los datos recopilados se muestran en la tabla 4. El plot muestra de la rugosidad en la porosidad de la superficie de hidroxiapatita mediante microscopía confocal se aprecia en la Figura 7.

P	Area	Mean	Min	Max	Angle	Lenght
1	3.682	233.75	0	255	0	5.26
2	40.505	217.45	0	255	-0.476	5.488
3	16.877	235.309	0	255	0	5.898
4	88.375	125.257	0	255	-0.109	6.966
5	47.563	213.465	0	255	0	4.334
6	28.845	232.628	0	255	-1.005	6.04
7	36.516	226.613	0	255	0	7.292
8	47.256	215.511	0	255	-0.407	6.711
9	3.682	233.75	0	255	0	6.091
10	40.505	217.45	0	255	-0.476	7.247
11	16.877	235.309	0	255	0	6.276
12	88.375	125.257	0	255	-0.109	6.34
13	47.563	213.465	0	255	0	5.26
14	28.845	232.628	0	255	-1.005	5.26
15	36.516	226.613	0	255	0	5.488

Tabla 4. Análisis de rugosidad de una superficie de hidroxiapatita mediante la medición de la distancia de 15 poros mediante microscopia confocal

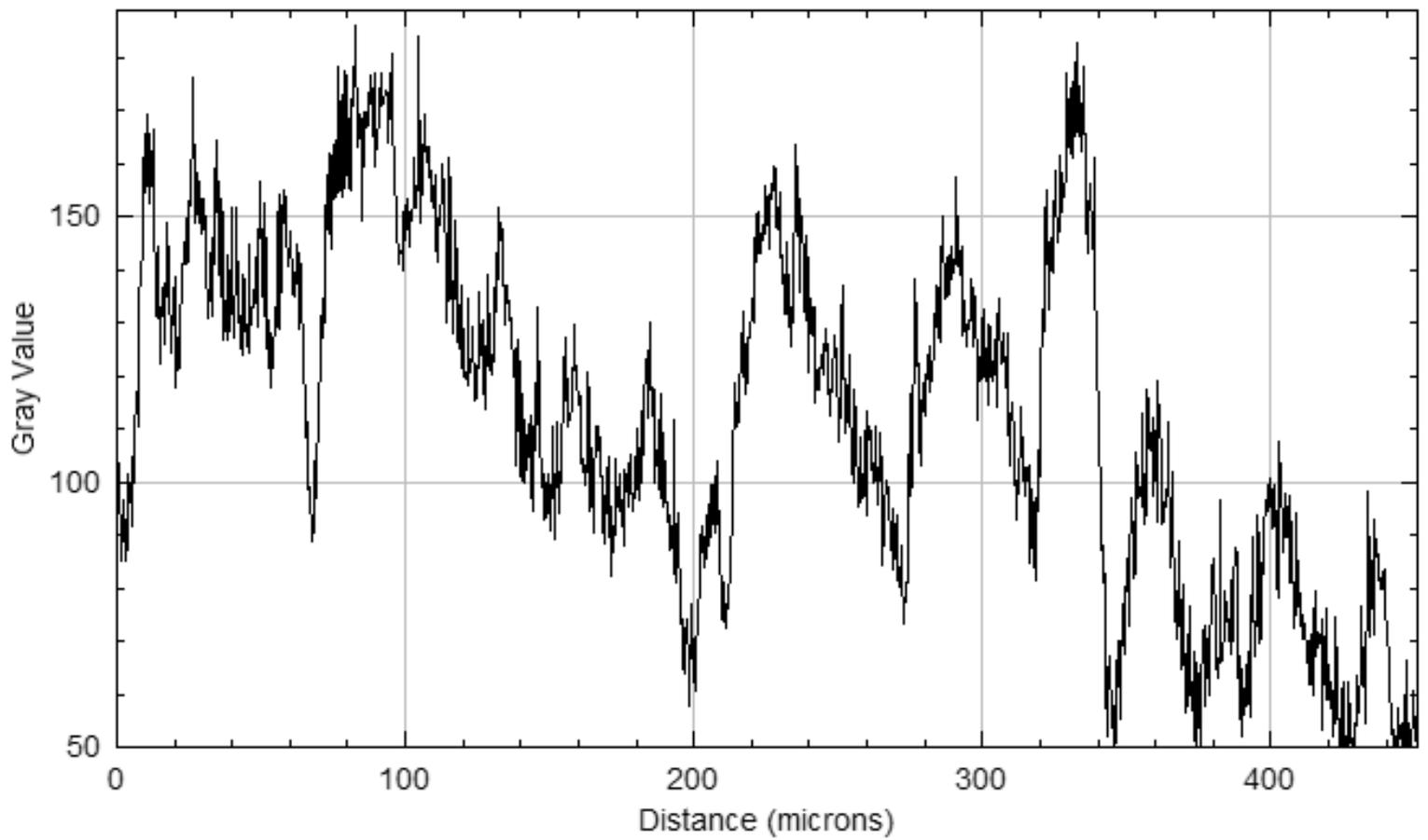


Fig. 7. Plot muestra mediante microscopía confocal en escala de grises para la determinación de la rugosidad de una superficie de hidroxiapatita.

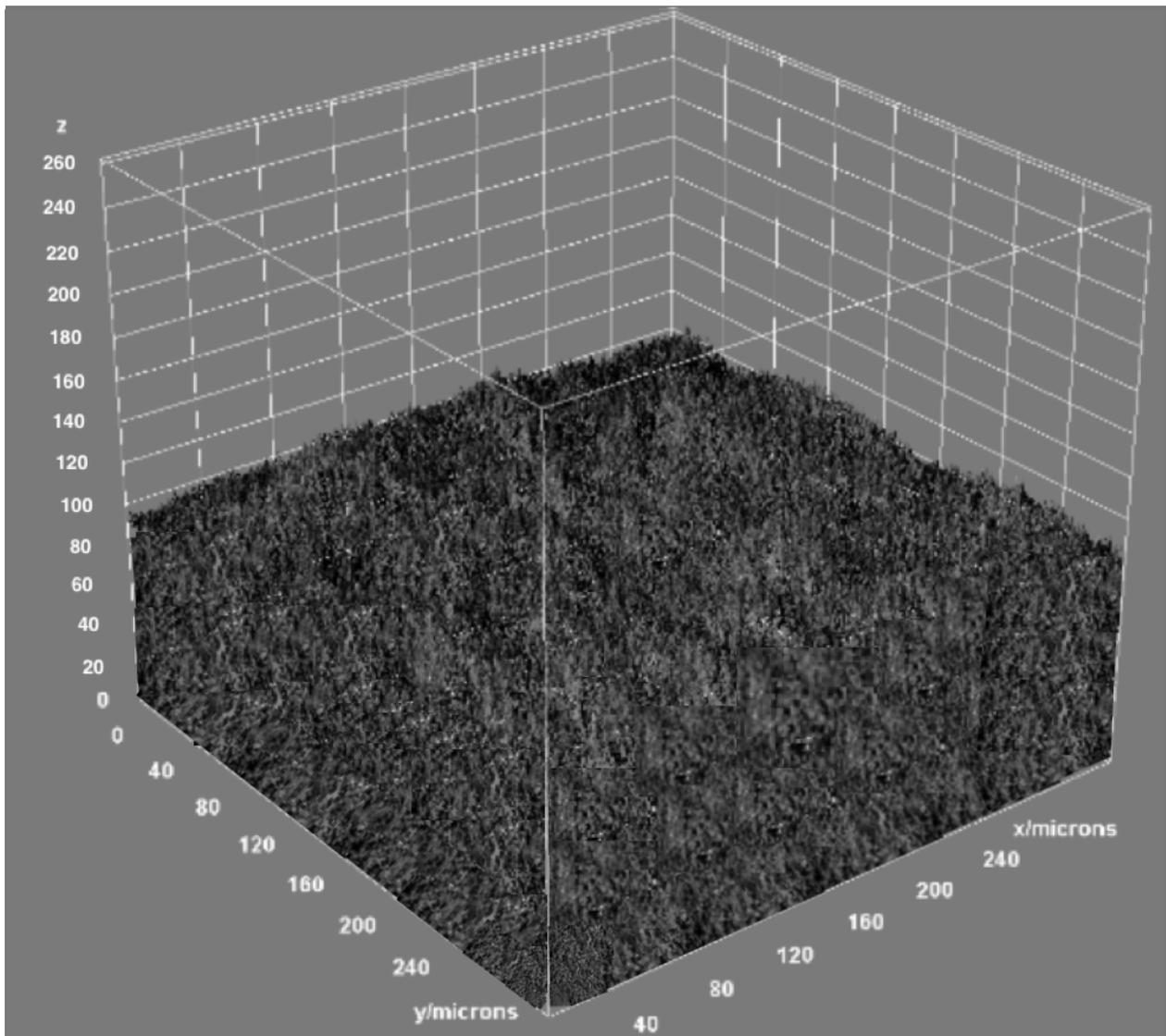


Fig. 8. Imagen obtenida por microscopio confocal, se aprecia una biopelícula *in situ* en donde se determina su grosor en aproximadamente $94.73 \mu\text{m}$.

IV. DISCUSIÓN

Se ha postulado que el 99% de las bacterias existen en calidad de biopelículas. Estas estructuras se forman cuando las bacterias libres flotantes perciben una superficie, se adhieren a ella y elaboran señales químicas para coordinar diferenciación y la formación de una estructura, incluyendo el desarrollo de una cubierta de exopolisacárido protector, la cual representa una estrategia de supervivencia ante fluctuaciones medioambientales.

Las biopelículas son importantes debido a que algunas especies microbianas residentes de las mismas, contribuyen al mantenimiento de un microambiente ecológico en la salud bucal y general del individuo, pero a su vez, el desequilibrio de esta microflora puede desencadenar una afección en el estado de salud, asociado a la agregación y colonización de nuevos microorganismos causantes de enfermedades polimicrobianas.

En la actualidad, existe una problemática en la población mundial referente al uso indiscriminado de antimicrobianos, lo cual representa un tema de salud, catalogado por la OMS como de “alto riesgo” debido al incremento desmedido de diferentes especies de microorganismos y a la poca sensibilidad de los antimicrobianos para limitar la reproducción de estos en el hospedero de una manera eficaz. Debido a esta situación, la búsqueda constante de alternativas y la puesta en marcha de diferentes líneas de investigación cobran cada vez mayor relevancia con la finalidad de minimizar el daño causado por estos microorganismos.⁴⁷

Desde tiempos antiguos, el uso de herbolaria y plantas medicinales marcaron un hito referente al descubrimiento de los medicamentos actuales, en donde gracias a estas, se logró revolucionar la industria farmacéutica con el descubrimiento de los antibióticos a finales de los años 20's. Uno de los ejemplos importantes ampliamente estudiado ha sido el del *Allium sativum* como agente medicinal debido a sus propiedades en el organismo humano relacionado con su capacidad para combatir enfermedades ocasionadas por microorganismos, además, estudios actuales han identificado algunas otras propiedades asociadas con efectos anticancerígenos, antitrombóticos e inmunomoduladores.²³

La mayoría de los estudios referentes al empleo del *Allium sativum* exponen su actividad de forma *in vitro*, debido a esto, identificar su actividad en un microambiente adecuado, bajo las mejores condiciones nos motiva a minimizar estas limitantes con la finalidad de obtener resultados cada vez más alentadores.

Los estudios *in situ* por su parte, son la forma mas cercana de semejanza al estudio *in vivo* de la propia formación de la biopelícula oral en un microambiente normal, el cual, se encuentra adherido a la superficie de los dientes, y de esta manera, llevamos a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana del compuesto dialil disulfuro derivado del *Allium sativum* contra la misma biopelícula dental.

Como parte nuestro proyecto hemos identificado la descripción de diferentes estudios de biopelículas *in situ* los cuales se han desarrollado con base a distintos tipos de metodologías, algunas de ellas asociadas al tiempo necesario para la maduración de la misma, sin embargo, se ha determinado que la metodología a aplicar debe ser “no perturbadora” para cualquiera de los distintos agentes antimicrobianos, y de esta forma, no alterar la relación entre el estado celular, la composición de la matriz extracelular y el sustrato de la misma. Con base en esto, hemos establecido los sustentos adecuados aplicados en nuestro estudio para poder obtener una biopelícula madura en un lapso de tiempo de 48 horas, crecida de forma *in situ* en discos de hidroxiapatita bajo las condiciones medioambientales propias de la cavidad bucal.²²

Llevar a cabo el crecimiento de la biopelícula de forma *in situ* representa un reto, cuya importancia genera conocimientos relevantes debido al nicho ecológico que representa la cavidad bucal, referente al comportamiento de los microorganismos al interactuar con las condiciones ambientales propias de la misma como lo son la temperatura, pH, y la interacción con los líquidos inherentes como la saliva y el líquido crevicular.

Diferentes autores han llevado a cabo la evaluación del crecimiento de la biopelícula en términos de maduración, en los cuales, determinan periodos de tiempo iniciales de 4 horas. Es importante mencionar que antes de este tiempo, es posible que existan bacterias adheridas a la biopelícula. Estudios *in situ* sobre maduración de la biopelícula, utilizan dispositivos específicos para su crecimiento, han analizado la

película adquirida en un lapso de tiempo de 2 horas, otros autores han analizado UFC desde los primeros 10 minutos, o han aplicado técnicas de FISH a los 30 min. En nuestro estudio permitimos crecer la biopelícula por un lapso de tiempo de 48 horas, sabiendo que es el mínimo necesario para obtener la maduración de la misma propiamente dicha y no solamente con los colonizadores primarios, sino también los microorganismos de enlace.

Se han identificado diversos estudios *in vitro* referente a la actividad antimicrobiana de diferentes compuestos pertenecientes a fitoterapia, los cuales actúan sobre biopelícula bacteriana durante un periodo de tiempo relativo al empleado en nuestra metodología de investigación, donde estos mostraron resultados prometedores al disminuir el número de UFC en comparación con antimicrobianos específicos de una farmacoterapia convencional.²⁵

Isabel Prada López et al. mencionan en su publicación de 2016, diferentes dispositivos intraorales para llevar a cabo el desarrollo y crecimiento de una biopelícula oral sin interrupción. Ella identifica el crecimiento de la misma asociando los discos de hidroxiapatita en posiciones palatinas, linguales y vestibulares, de manera similar a los discos empleados en nuestra metodología, de forma que estabilizó los mismos mediante diferentes elementos como dispositivos termoplásticos, polímeros o superficies metálicas; esto nos permitió emplear un método de retención similar en el desarrollo del dispositivo intraoral a utilizar en nuestro estudio con la finalidad de hacer crecer una biopelícula bacteriana *in situ*.²²

Jintao Yu Wang et al. en el 2022, determinaron en su estudio la capacidad de compuestos derivados de la naturaleza, específicamente la ficina, el cual actúa sobre una biopelícula mixta. Ellos hicieron crecer biopelícula de manera *in vitro* en donde predominantemente se encontraba microorganismos fúngicos como *C. albicans* y microorganismos periodontopatógenos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en donde la ficina disminuyó las UFC de manera significativa en comparación con medicamentos establecidos para el tratamiento de infecciones fúngicas como el fluconazol, el cual causó disminuciones de 2.14 y 2.05 log¹⁰ UFC, resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio. Ellos identificaron en su estudio que el efecto de la ficina sobre *C. albicans* y

Aggregatibacter actinomycetemcomitans no solamente inhibía la formación de las biopelículas mixtas sino que también desprendía a las biopelículas preformadas llevando así a la disrupción de las mismas.⁵⁹ Con base en los resultados obtenidos en el estudio anteriormente mencionado, podemos dilucidar que un efecto similar con otro compuesto distinto a la ficina como lo es el dialil disulfuro, además de desprender las biopelículas maduras establecidas, siendo así su actividad más importante, bajo las condiciones adecuadas, puede actuar sobre la formación inicial de los primeros colonizadores y de esta forma impedir el establecimiento de la biopelícula para su posterior maduración.

Velliyagounder et al. en 2012, identificaron la eficacia de los compuestos de dialilo actuando específicamente contra el microorganismo periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ellos identificaron una disminución de 3 log; $P < 0.01$ comparadas con el grupo control, además de una alteración en la arquitectura celular del periodontopatógeno al ser analizado mediante SEM. Añadido a esto, mediante su estudio de citometría de flujo en células OBA9, no se demostró apoptosis ni detención del ciclo celular en las concentraciones terapéuticas del dialil disulfuro.⁷¹

Vallerinteavide et al. en 2019, identificaron la actividad de los compuestos organosulfurados específicamente sobre biopelícula bacteriana crecida de forma *in vitro*, en donde determinaron que la actividad de estos compuestos extraídos del *Allium sativum* podían prolongarse durante tiempos específicos mediante tasas de liberación mediadas por nanopartículas precargadas en preparaciones sol-gel. Ellos identificaron que las tasas de liberación de las nanopartículas precargadas con los extractos de dialil disulfuro permitían disminuir los tiempos de metabolismo para llevar a cabo liberaciones lentas y prolongadas con una explosión inicial de 30 minutos hasta un periodo de tiempo de 4 horas, disminuyendo de manera exponencial las UFC identificadas mediante microscopía confocal laser, estudio que nosotros empleamos en nuestra metodología experimental para identificar los microorganismos vivos y muertos presentes en la biopelícula dental²⁷

Joe Latimer et al. identificaron que la actividad del cloruro de cetilpirimidio, así como del fluoruro de sodio, puede llevar a cabo una “inactivación bacteriana” y una

inhibición en la desmineralización del esmalte dental mediante el empleo de enjuagues bucales comerciales, en donde ellos utilizaron tinciones de fluorescencia mediante un análisis de viabilidad vivo/muerto y demostraron una disminución del 60% de las células viables, resultados similares a los obtenidos en nuestra metodología de estudio al tratar la biopelícula bacteriana mediante los aceites esenciales de un colutorio comercial en un lapso no mayor a 5 minutos y evaluando la actividad bactericida mediante el kit de viabilidad celular live & dead.²⁶

Sunaina Shetty et al. en el 2020 llevaron a cabo exámenes de comparación de tiempo-letalidad de los compuestos organosulfurados derivados del *Allium sativum* contra *Psidium guava* el cual actuó sobre periodontopatógenos crecidos en una biopelícula crecida *in vitro*, ellos identificaron el tiempo de letalidad de cada uno de los grupos experimentales en un rango de 4 a 6 horas, disminuyendo en 60% las UFC, resultados que se mostraron similares a los que obtuvimos en nuestro estudio experimental.²⁸

Es importante mencionar que los estudios anteriormente descritos llevan a cabo el análisis del comportamiento de compuestos organosulfurados o bien, extractos naturales derivados de fitoterapia, los cuales actúan sobre biopelículas *in vitro*; es por eso que la importancia de identificar una biopelícula *in situ* nos puede proporcionar resultados que se asemejen a la actividad biológica en un individuo establecido.

En nuestro estudio llevamos a cabo el análisis del efecto antimicrobiano sobre la biopelícula dental mediante su interacción con soluciones de dialil disulfuro de manera *in situ*, comparada con un compuesto antibacteriano a base de aceites esenciales en donde los resultados obtenidos nos permiten equiparar la actividad de ambos compuestos en un 60% posterior al análisis de viabilidad y muerte celular con los estudios *in vitro* previamente descritos.

Existen otros estudios en diversas áreas de la medicina incluyendo la cavidad bucal donde la inhibición del crecimiento bacteriano y la actividad bactericida se atribuyen a la alicina y los tiosulfitos, además, se ha informado que las especies de *Allium sativum* 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 oxidantes, incrementando de esta forma, la síntesis de antioxidantes endógenos o reduciendo la producción de oxidantes como las especies de radicales libres de oxígeno, es por ello que entender la biodisponibilidad del dialil disulfuro después del consumo es fundamental para comprender la dosificación del compuesto y de esta forma poder obtener los beneficios terapéuticos. También se ha observado que su actividad antiinflamatoria se debe a la inhibición de la migración de granulocitos neutrófilos al epitelio, además de sus propiedades antimicrobianas contra bacterias grampositivas y gramnegativas resistentes a los antibióticos, sumado a esto, la actividad antiviral de los extractos del ajo ha sido evaluada contra las especies de influenza B, rinovirus humano tipo 2, citomegalovirus humano (HCMV) y herpes simple tipo 1 y 2.²³

Específicamente, se evaluaron los cambios en la estructura de la biopelícula madura mediante pruebas de fluorescencia de viabilidad celular posterior a la interacción de una solución a base de dialil disulfuro y aceites esenciales *in situ*, al ser considerada la biopelícula oral como agente causal necesario en infecciones en cavidad bucal como la enfermedad periodontal.

En nuestro estudio, identificamos una disminución de la viabilidad celular en la biopelícula bacteriana al interactuar con los compuestos a bases de dialil disulfuro, esto en comparación con la letalidad de los aceites esenciales al interactuar con la misma biopelícula bacteriana. Las unidades arbitrarias de fluorescencia mostraron un promedio de letalidad de 17.7416 U.I. al interactuar la biopelícula con los compuestos a base de dialil disulfuro en comparación con las 20.6165 U.I. de los aceites esenciales sobre la misma biopelícula.

La evidencia recopilada mediante las micrografías obtenidas con el microscopio confocal de fluorescencia demuestran que la principal afectación letal de los compuestos antes mencionados sobre la estructura de la biopelícula actúan tanto en capas superficiales como en capas más profundas, mostrando una afectación de los primeros colonizadores bacterianos, lo cual influye directamente en la progresión y el desarrollo de maduración de la biopelícula, así como en la adhesión de futuros

colonizadores secundarios afectando y disrumpiendo a la biopelícula bacteriana de su actividad.

Una de las limitantes en nuestro estudio de investigación, debido a que no se ha abordado mucho en este tema es la vía de administración de los compuestos organosulfurados en su concentración mínima inhibitoria hacia el ente biológico, ya que el tiempo de liberación, metabolismo y excreción del mismo, conlleva a limitar riesgos y efectos nocivos en el organismo y de esta forma prolongar la actividad antimicrobiana para contrarrestar el crecimiento y en un futuro la formación de la biopelícula adquirida.

La progresión y el desarrollo de esta línea de investigación nos pueden llevar a futuros resultados clínicos que nos permitan seguir identificando la actividad de los compuestos de dialil disulfuro en estadios iniciales para poder utilizar esta terapia en un futuro de una manera profiláctica, con la finalidad de llevar a cabo la prevención y tratar de inhibir la adhesión de la biopelícula bacteriana en superficies dentarias o en dispositivos médicos implantables, esto debido a que los pacientes portadores de estos dispositivos pertenecen a grupos etarios con un alto riesgo para permitir la colonización y proliferación de microorganismos asociados. Además, refiriéndonos específicamente de la cavidad bucal, el poder limitar el desarrollo de la enfermedad periodontal nos ayuda a mejorar la calidad de vida de cada individuo mediante la preservación de las estructuras dentarias y la limitación en el desarrollo de la misma, la cual afecta a mas de 70 000 adolescentes en la población hispana anualmente y de esta manera limitar el impacto en los factores funcionales, estéticos, económicos y psicológicos en la población actual.

Los estudios previos nos permiten identificar diferentes alternativas de tratamiento contra la adhesión y proliferación de microorganismos causantes de enfermedades polimicrobianas, enfocándonos en una terapia auxiliar que contrarreste las actuales resistencias hacia los medicamentos farmacológicos convencionales, considerando que la educación y el control de los fármacos hacia los individuos enfermos es el primer paso para llevar a cabo una terapia farmacológica adecuada contra las diferentes especies de microorganismos colonizadores existentes del cuerpo humano.

Definimos que el dialil disulfuro exhibe un efecto antimicrobiano significativo contra la biopelícula dental *in situ*, destacando la termoestabilidad de sus componentes, los cuales permiten que sus propiedades antimicrobianas no se vean afectadas por la presencia de componentes como la saliva, temperatura y pH, lo que permite a este compuesto como una alternativa adicional para su uso como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades dentales como lo es la enfermedad periodontal.

V. CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró realizar un modelo para análisis de la estructura de una biopelícula formada *in situ*, a través microscopia confocal, con características similares a su formación ecológica. A través de este modelo, se analizó específicamente el efecto en la viabilidad y muerte celular de la biopelícula de diferentes compuestos antimicrobianos.

En este estudio se observó una reducción en la viabilidad de la estructura de la biopelícula en el grupo de dialil disulfuro, distante al efecto del compuesto a base de aceites esenciales y similar al control. Respecto al efecto antibacterial, este fue moderado para el dialil disulfuro respecto del control y con un efecto cercano respecto a la muerte celular del compuesto de aceites esenciales. Por tanto, concluimos que el dialil disulfuro parece tener un efecto moderado en la estructura de la biopelícula oral formada *in situ* bajo las condiciones del presente estudio.

Continuar con el estudio y el desarrollo de las diferentes líneas de investigación sobre la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos naturales nos permitirá seguir adquiriendo información esto, con la finalidad de brindar distintas alternativas farmacológicas que nos permitan limitar el crecimiento de los microorganismos aunado a la terapia farmacológica convencional actual.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent. Assoc.* 2014; 137 (suppl):105-155
 - 2.- Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci. Rev.* 2015;9:65-107
 - 3.- Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect. Dis.* 2002;8(9):881-90
 - 4.- Mirza YH, Tansey R, Sukeik M, Shaath M, Haddad FS. Biopelícula y el papel de los antibióticos en el tratamiento de las infecciones periprotésicas de la articulación de la cadera y la rodilla. *Abra Orthop J* 2016;10:636–645.
 - 5.- Vinh DC, Embil JM. Infecciones relacionadas con dispositivos: una revisión. *J Long Term Eff Med Implants* 2005;15:467–488
 - 6.- Tonetti MS, Greenwel H, Kornman KS. Periodontitis case definition. *Journal of Clinical Periodontology.* 2018. 45, S149-S161
 - 7.- Scott C, M SC. Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear, Nose, Throat J.* 2009; 82 (suppl): 18-20)
 - 8.- Pawowski, Ward, Roland PS. Bacterial biofilm formation on a human cochlear implant. *Otol Neurotol* 2013; 26:972-5
 - 9.- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25:134–144
 - 10.- Portera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*, 2013;283:1837-9
 - 11.- Costerton JW, Geesey, Chengkj. How bacteria stick. *Sci Am*, 2014;238:86-95
 - 12.- Colón-González MT, Membrillo-Hernández J. Comunicación entre bacterias. 2015
- http://www.microbiologia.org.mx/microbios_enlinea/CAPITULO_04.pdf
- 13.- Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2005;50:645–651.
 - 14.- Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J* 2002;52:433–437

- 15.- 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, v. 56, no. 5, p. 2397-2407.
- 16.- Zakaria EA. The inhibitory action of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria. *Eur Food Res Technol* 2004;218:460–464.
- 17.- Grudzinski, A. Frankiewicz-JOZKO, J. Bany Phytomedicine. Diallyl sulfide a flavour component from garlic (*Allium sativum*) attenuates lipid peroxidation in mice infected with *Trichinella spiralis*. 2005 Vol. 8(3), pp. 174–177
- 18.- Yen-Ping Lei, Cheng-Tzu Liu, Lee-Yan Sheen, Haw-Wen Chen and Chong-Kuei Lii. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide protect endothelial nitric oxide synthase against damage by oxidized low-density lipoprotein. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, S42–S52
- 19.- Rahman K. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *J Nutr* 2001;131:977S– 979S.
- 20.- 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.
- 21.- 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
- 22.- Prada-López I, Quintas V, Vilaboa C, Suárez-Quintanilla D and Tomás I (2016) De-vices for In situ Development of Non-disturbed Oral Biofilm. A Systematic Review. *Front. Microbiol.* 7:1055
- 23.- El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, G Wasef L, Elewa YHA, A 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
- 24.- Elnima EI, Ahmed SA, Mekkawi AG, Mossa JS. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie* 1983;38:747–748.
- 25.- Bakri, I. M., and C. W. Douglas. 2005. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 50:645-51.
- 26.- Latimer et al. *BMC Microbiology* (2015) 15:169 DOI 10.1186/s12866-015-0501-
- 27.- Girish VM, Liang H, Aguilan JT, Nosanchuk JD, Friedman JM, Nacharaju P. Anti-biofilm activity of garlic extract loaded nanoparticles. *Nanomedicine.* 2019

Aug;20:102009. doi: 10.1016/j.nano.2019.04.012. Epub 2019 May 11. PMID: 31085344; PMCID: PMC6702047.

28.- Shetty S, Shetty RM, Rahman B, Reddy MS, Shetty SR, Vannala V, and others. Comparison of the time-kill assay to evaluate the antimicrobial efficacy of garlic (*Allium sativum*) and guava (*Psidium guajava*) extracts on periodontal pathogens. *Contemp Clin Dent* 2021;12:389-95.

29.- Belas, R. 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22 (9): 517-522.

30.- Colvin, KM; Gordon, VD; Murakami, K; Borlee, BR; et al. 2011. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 7 (1):e1001264

31.- Finkel, SE; & Kolter, R. 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *Journal of Bacteriology*, 183 (21):6288-6293.

32.- Marsh PD, Bradshaw DJ. Microbial community aspects of dental plaque. En: Newman HN, Wilson M, eds. *Dental plaque revisited. Oral biofilms in health and disease*. UK: BioLine;1999:237-53

33.- Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8(2):263-71.

34.- Marquis RE. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *J Int Microbiol* 1995;15:198-207.

35.- Litgarten MA. Formation of dental plaque and other oral biofilms. En: Newman HN, Wilson M, eds. *Dental Plaque revisited. Oral biofilms in health a disease*. UK:BioLine;1999:187-210

36.- Marshall KC. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *ASM News* 1992;58(4):202-8

37.- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrabder PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:513-52

38.- van Houte J. Role of microorganisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994;73(3):672-81

39.- Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Res* 1976;9:65-107

40.- Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1986;13:905-11

- 41.- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? SGM Special Lectura. Microbiology 2003;149:279-94
- 42.- Scannapieco FA. Saliva-bacterium interaction in oral microbial ecology. Crit Rev Oral Biol Med 1994;5:203-48
- 43.- Kaplan JB, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of Staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrob agents chemother 2004;48:2633-2636
- 44.- Gristina AG. Biofilms and chronic bacterial infections. Clin Microbiol Newsletter 1994; 16: 171-178
- 45.- Sadekuzzaman, M; Yang, S; Mizan MFR; & Ha, SD 2015. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 14(4):491-509
- 46.- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001;9: 34-39
- 47.- Stewart PS, Corterton JW. Antibiotic resistance of bacterial in biofilms. Lancet 2001;358: 135-138.
- 48.- Bodeker G, Kronenberg F. A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. AJPH 2002;92:1582-91
- 49.- Montes M, Wilkomirsky T. Compendio de Fitoterapia. Concepción, Chile: Editorial. Universidad de Concepción; 1996;p. 4-9
- 50.- Argolo A, Pletsch M, Coelho L. Antioxidant Activity of Leaf Extracts from *Bauhinia monandra*. Bioresour Technol 2004; 95: 229-339
- 51.- Hoffmann A. *Plantas Medicinales de Uso Común en Chile*. Santiago, Chile: Editorial Fundación Claudio Gay. 1992. p. 178
- 52.- Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. *Plantas Medicina- les de Uso en Chile: Química y Farmacología*. Santiago, Chile: Editorial Universitaria. 1999; p. 57-9
- 53.- Trease, Evans W. *Farmacognosia*. 15th ed. España: Edito- rial Elsevier Limited. 2006. p. 41-5
- 54.- Bodeker G, Kronenberg F. A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. AJPH 2002; 92: 1582-91

- 55.- Buommino E, Scognamiglio M, Donnarumma G, Fiorentino A, D'Abrosca B. Avances recientes en enfoques antibiopelícula basados en productos naturales para controlar infecciones. *Mini Rev Med Chem* 2014;14:1169–1182
- 56.- Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. El modo de acción de la alicina: captura de radicales e interacción con proteínas que contienen tiol. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1379:233–244
- 57.- Ankri S, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Mirelman D. La alicina del ajo inhibe fuertemente las cisteína proteinasas y los efectos citopáticos de *Entamoeba histolytica*. *Agentes antimicrobianos Chemother* 1997;41:2286–2288
- 58.- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:187-209.
- 59.- Yu J, Wang F, Shen Y, Yu F, Qiu L, Zhang L, Chen Y, Yuan Q, Zhang H, Sun Y, Zhang K. Inhibitory effect of ficin on *Candida albicans* biofilm formation and preformed biofilms. *BMC Oral Health*. 2022 Aug 13;22(1):350. doi: 10.1186/s12903-022-02384-y. PMID: 35964034; PMCID: PMC9375270.
- 60.- Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., & Leiva, J.. (2019). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163-175
- 61.- Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147: 3-9
- 62.- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183: 2888-2896
- 63.- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79
- 64.- Kommerein N, Stumpp SN, Mu'sken M, Ehlert N, Winkel A, Ha'ussler S, et al. An oral multispecies biofilm model for high content screening applications. *PLoS ONE* 2017; 12-(3): e0173973.
- 65.- Coling D, Kachar B. Principles and application of fluorescence microscopy. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001. Chapter 14: Unit 14. 10. doi: 10.1002/0471142727.mb1410s44
- 66.- White JG, Amos WB, Fordham M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol*. 1987; 105: 41-48.
- 67.- Sal3n et al; 2017; Li et al; 2013; Yi et al; 2005

68.- Asquino, Natalia, García, Ma. Victoria, Mayol, Magdalena, Andrade, Ernesto, & Bueno Rossy, Luis Alexandro. (2016). Aceites Esenciales: Una opción quimioterapéutica en Periodoncia. *Odontoestomatología*, 18(28), 4-10. Recuperado en 03 de septiembre de 2023, de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-93392016000200002&lng=es&tlng=es.

69.- Charles CH, Pan PC, Sturdivant L, Vincent JW. In vivo Antimicrobial Activity of an Essential Oil-Containing Mouthrinse on Interproximal Plaque Bacteria. *J Clin Dent*. 2000; 11:94-7.

70.- Dewhirst FE. Structure-activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. *Prostaglandins* 1980; 30:209-22

71.- Velliyagounder K, Ganeshnarayan K, Velusamy SK, Fine DH. In vitro efficacy of diallyl sulfides against the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2397-407. doi: 10.1128/AAC.00020-12. Epub 2012 Feb 13. PMID: 22330917; PMCID: PMC3346624.