



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL.**

**“Generación de una comunidad bacteriana asociada a
periodontitis para estudios *in vitro*”**

Oscar Alexis Bastias Guzmán

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTORA PRINCIPAL

Prof. Anilei Hoare Teuche

TUTORA ASOCIADA

Prof. Patricia Palma Fluxá

Adscrito a Proyecto FIOUCH-S19-12, Línea de Investigación LI2024/05

**Santiago, Chile
2024**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y
MEDICINA ORAL.**

**“Generación de una comunidad bacteriana asociada a periodontitis para
estudios *in vitro*”**

Oscar Alexis Bastias Guzmán

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTORA PRINCIPAL

Prof. Anilei Hoare Teuche

TUTORA ASOCIADA

Prof. Patricia Palma Fluxá

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a cada persona que me acompañó en este proceso de formación para convertirme en cirujano dentista.

AGRADECIMIENTOS

Quiero partir agradeciendo a mi familia, en especial a mis padres por su apoyo incondicional durante toda mi vida, por guiarme, enseñarme valores y ayudarme a crecer día a día.

También agradecer a mis amigos que me acompañaron en este proceso, ya sea sufriendo por alguna UTE o disfrutando de algún momento de esparcimiento, esta carrera sin duda tiene muchos momentos estresantes y frustrantes, por eso su presencia y ayuda significó mucho.

A la Dra. Anilei Hoare y Daniela Salinas por enseñarme, preocuparse y ayudarme a sacar este proyecto adelante.

Al equipo del laboratorio de microbiología e inmunología oral de la facultad de odontología de la Universidad de Chile y sus integrantes por la ayuda prestada e incorporarme en su equipo de trabajo para desarrollar los experimentos.

Al proyecto FIOUCH-S19, de la línea de investigación LI2024/05 en el cual se enmarcó este trabajo de tesis.

Índice

1. Resumen	1
2. Marco teórico	3
2.1 Microbiota asociada a la cavidad oral.....	3
2.2 Periodontitis.....	4
2.3 Patogenia de la periodontitis.....	4
2.4 Características de especies representativas de comunidades.....	7
subgingivales en la transición de salud a periodontitis	
2.5 Modelos de estudios de comunidades subgingivales.....	9
3. Hipótesis y Objetivos	15
3.1 Hipótesis.....	15
3.2 Objetivo general.....	15
3.3 Objetivos específicos.....	15
4. Materiales y métodos	16
4.1 Cepas bacterianas.....	16
4.2 Condiciones de cultivos.....	16
4.3 Generación de comunidades polibacterianas <i>in vitro</i>	18
4.4 Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).....	19
4.5 Cuantificación de especies bacterianas por qPCR.....	20
4.6 Análisis estadístico.....	21
5. Resultados	22
5.1 Generación de cultivos puros.....	22
5.2 Generación de comunidades polimicrobianas.....	26
5.3 Caracterización de la comunidad asociada a periodontitis.....	33
6. Discusión	36
7. Conclusiones	43
8. Referencias bibliográficas	44

RESUMEN:

Introducción: En las comunidades asociadas a periodontitis, predominan especies inflamofílicas y proteolíticas, relacionadas con la etiología de la enfermedad. El desarrollo de modelos de estudio basados en comunidades para el estudio de enfermedades polimicrobianas como la periodontitis, son claves para obtener resultados que consideren las interacciones interespecies. En la literatura se reportan diferentes modelos de biopelículas y comunidades planctónicas en quimiostatos que han dado respuesta a distintas preguntas de investigación. No obstante, existe una necesidad de desarrollar modelos de fácil implementación y que aseguren una buena representatividad de las comunidades subgingivales. El objetivo de este trabajo es obtener una comunidad microbiana *in vitro* con especies bacterianas características de comunidades subgingivales de pacientes con periodontitis.

Metodología: Se generaron inóculos a partir de cultivos puros estandarizados de las siguientes especies: *Actinomyces oris* (Ao), *Streptococcus gordonii* (Sg), *Porphyromonas endodontalis* (Pe), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella melaninogenica* (Pm), *Streptococcus constellatus* (Sc), *Tannerella forsythia* (Tf), *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (Fn) y *Veillonella parvula* (Vp). Para generar las comunidades, se realizaron 3 protocolos diferentes en los cuales variaba la cantidad de inóculo, días de extracción de muestras y suplementación de medio fresco. Los cultivos estandarizados conservados a -80°C, se inocularon en un medio basado en mucina y suero para realizar la comunidad. Se monitoreó el crecimiento por 14 días, colectando muestras para recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en medios selectivos, y para cuantificación de bacterias totales y especies individuales por PCR cuantitativo (qPCR).

Resultados: Se obtuvieron inóculos de cultivos puros de todas las especies incluidas en esta comunidad. Se realizaron 3 protocolos de comunidad, en el protocolo 1 y 2 no existe crecimiento de todas las especies incluidas en la comunidad. En el protocolo 3 se observa que todas las especies presentaron crecimiento, la fase estacionaria se alcanzó el día 7. Los valores de UFC/mL variaron entre 10^6 a 10^{12} .

Conclusiones Se generó una comunidad polimicrobiana asociada a periodontitis en estado estacionaria. Para lograr este objetivo en un cultivo estático es necesario suplementar con medio fresco para permitir el desarrollo de todas las especies dentro de la comunidad.

MARCO TEÓRICO.

Microbiota asociada a la cavidad oral.

La cavidad oral presenta un ambiente propicio para la colonización y establecimiento de un microbioma diverso, que incluye bacterias, hongos, virus, arqueas y protozoos (Baker y cols., 2024). Se estima que hay como mínimo 700 especies bacterianas diferentes conviviendo en la cavidad oral, las cuales colonizan diferentes superficies de acuerdo a sus necesidades ambientales y nutricionales, entre las cuales cuentan la superficie dental, lengua, surco gingival, entre otras (Arweiler y cols., 2016). Estas especies pueden vivir de forma planctónica o formar parte de biopelículas. La biopelícula se puede definir como una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido y que muestran un comportamiento diferente en su tasa de crecimiento y expresión génica en comparación a su desarrollo en forma planctónica (Donlan y Costerton, 2002). Interesantemente, la formación de biopelículas en los distintos hábitats del ser humano depende de interacciones específicas entre microorganismos y el hospedero y su formación confiere beneficios a estas especies, tales como la protección frente a agresiones externas, tolerancia a antimicrobianos, interacciones nutricionales, además la proximidad entre los microorganismos favorece la comunicación inter especies (Sarduy y González, 2015).

En el caso de la microbiota oral, cuando está en equilibrio con el hospedero lleva a un estado de salud oral, pero si ocurre un desbalance ecológico -disbiosis- se puede favorecer el crecimiento de especies asociadas a enfermedades (Diaz y cols., 2016). En la cavidad oral las enfermedades más comunes son la caries dental y las enfermedades periodontales, en esta última encontramos la periodontitis (OMS, 2022). Todas ellas comparten la característica de ser mediadas por comunidades polimicrobianas, por lo tanto, resulta interesante conocer la composición de tales comunidades y el tipo de interacciones inter microbianas y con el hospedero que se establecen durante la progresión de las enfermedades.

Periodontitis.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria, crónica y multifactorial (Kwon y cols., 2021). Se define como una pérdida de soporte de los tejidos periodontales debido a la inflamación, la cual se observa como una pérdida de inserción clínica interproximal de ≥ 2 mm en dos o más dientes no adyacentes. En la nueva clasificación de las enfermedades periodontales, un caso de periodontitis debe presentar por lo menos una de las siguientes condiciones: (i) Pérdida de inserción clínica interdientaria en dos o más dientes no adyacentes; (ii) Pérdida de inserción clínica vestibular ≥ 3 mm con bolsas > 3 mm en dos o más dientes. En ambas situaciones, la pérdida de inserción clínica no debe estar asociada a un factor local (Papapanou y cols., 2018).

La periodontitis es considerada un problema de salud pública debido a su alta prevalencia en la población, incluida la población chilena, se estima que a nivel mundial 796 millones de personas presentan una periodontitis grave (Bernabe y cols., 2017). En Chile, la prevalencia de pérdida de inserción clínica mayor o igual a 4 mm es de 93,45% en individuos de 35 a 44 años (Morales y cols., 2020). La periodontitis se caracteriza por la destrucción de los tejidos de inserción del diente con la migración apical del epitelio de unión, esta destrucción es producto de la respuesta inmune del hospedero estimulada por la presencia de una biopelícula subgingival disbiótica con predominio de especies patobiontes asociadas a periodontitis que provocan un estado de inflamación crónica en el individuo (Kwon y cols., 2021). Sus consecuencias van desde la pérdida de inserción hasta la pérdida de dientes, esto genera un impacto psicológico, económico y social en el individuo que la padece (Carvajal, 2016). Si bien, la presencia de una biopelícula subgingival enriquecida en patobiontes es necesaria, no es suficiente para desencadenar la enfermedad, por lo que el efecto que produce el desbalance ecológico a nivel subgingival depende tanto de factores microbianos como del hospedero y de la interacción entre ambos.

Patogenia de la Periodontitis.

Como se señaló anteriormente, la periodontitis se desarrolla como una respuesta inflamatoria no específica a una biopelícula subgingival donde predominan especies

patobiontes que favorecen la inflamación a través de mediadores proinflamatorios y cambios en el sistema inmune que provocan la destrucción de los tejidos de soporte periodontal (Herrera y cols., 2018). La forma en que se manifestará la enfermedad ya sea la rapidez en su progresión como de la gravedad de ésta, depende de la interacción de factores del hospedero, ambientales y de los agentes microbianos presentes. Entre los factores que pueden modificar la presentación de la periodontitis encontramos el consumo de tabaco (Rojas y cols., 2014), el embarazo y la presencia de enfermedades sistémicas como la diabetes (Méndez y cols., 2008).

La microbiota oral subgingival es compleja y está compuesta por múltiples especies. Con la aplicación de técnicas de secuenciación masiva, se ha logrado definir con mayor exactitud, la composición de tales comunidades. Así, en muestras subgingivales de pacientes chilenos periodontalmente sanos o con periodontitis, se han definido tres grupos (Abusleme y cols., 2013, Figura 1): (i) microbioma en salud: compuesto por taxas predominantes en salud y que disminuyen su proporción en enfermedad; (ii) microbioma subgingival central o del “core”: taxas presentes en proporciones equivalentes tanto en salud periodontal como en periodontitis; y (iii) microbioma en periodontitis: especies que aumentan su prevalencia y abundancia en periodontitis.

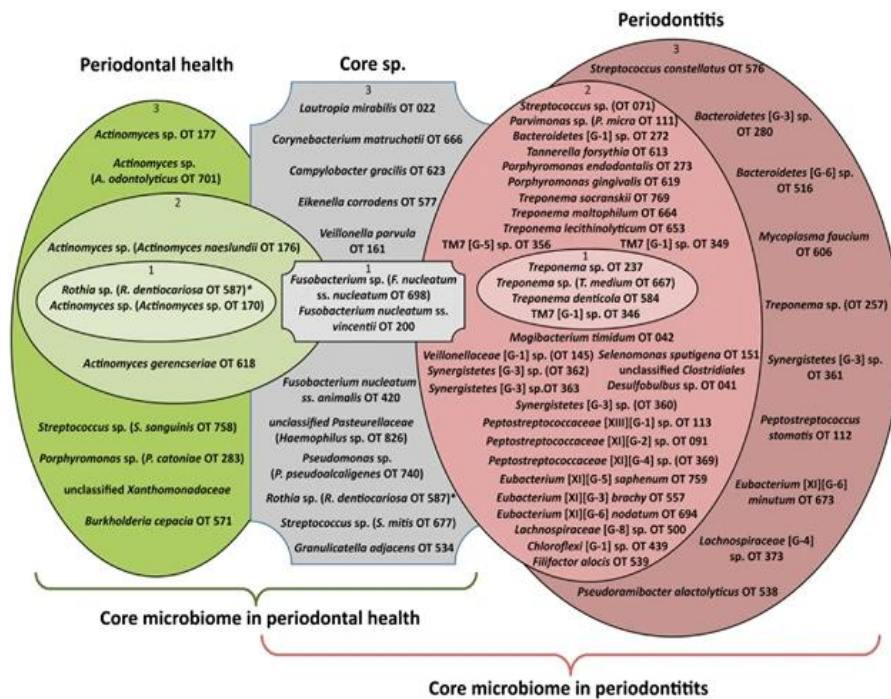


Figura 1: Especies bacterianas encontradas en salud, enfermedad y del “core”. Extraído de The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation (Abusleme y cols., (2013)). Se indica aquellas especies presentes en al menos el 50% de los individuos en estado de salud (verde), enfermedad (rojo) o en ambas condiciones para el caso de las integrantes del “core” (gris). Las subdivisiones marcadas con el número 1 son especies que presentan alta prevalencia y abundancia entre los individuos, el 2 representa especies con alta prevalencia, pero poca abundancia y en 3 son bacterias en que cada grupo presenta moderada prevalencia y baja abundancia.

Los resultados descritos son coherentes con otros estudios incluidos en Abusleme y cols. (2021) y Díaz y cols. (2016). Particularmente, el re-análisis de datos de secuenciación masiva de 11 estudios que caracterizaron las comunidades bacterianas en estado de salud periodontal, gingivitis y/o periodontitis, confirmó una mayor diversidad de especies en enfermedad comparado con salud. Así, se entiende que la periodontitis es causada por una disbiosis de la biopelícula subgingival en que ocurren sucesiones ecológicas que llevan al establecimiento de ciertas especies, sin que ocurra un reemplazo de las especies encontradas en salud (Abusleme y cols., 2021).

Los estudios mencionados han permitido tener una idea bastante acabada de la composición de la microbiota subgingival. Asimismo, se ha demostrado que los

cambios en el microbioma subgingival observados en la transición de salud a enfermedad son específicos.

Características de especies representativas de comunidades subgingivales en la transición de salud a periodontitis.

Pese a que existe evidencia del papel preponderante de especies patobiontes, tanto en el inicio como la progresión de la periodontitis, se ha demostrado que especies asociadas a salud y del “core” contribuirían al establecimiento de especies asociadas a enfermedad, generando interacciones específicas entre ellas que favorecen el establecimiento de la comunidad. Ejemplo de lo anterior, son *Actinomyces* spp. y *Streptococcus gordonii*, ambas anaerobias facultativas Gram positivo asociadas a salud periodontal. Más aún, corresponden a colonizadores primarios que favorecen la unión de *Porphyromonas gingivalis* -bacteria asociada a la periodontitis- a la biopelícula (Kolenbrander y cols., 1985). Particularmente, *S. gordonii* presenta 2 mecanismos que permiten la coagregación con *P. gingivalis*, representando una interacción clave para la colonización de la biopelícula en desarrollo por *P. gingivalis* (Cook y cols., 1998).

Asimismo, *Fusobacterium nucleatum* que se ha asociado tanto a enfermedades orales como extraorales, entre las cuales cuentan cáncer colorrectal (Konkel y cols., 2019), resultados adversos del embarazo y abscesos (Han, 2015), es una especie del “core” clave que interactúa con especies asociadas a salud como a enfermedad, entre las que destacan especies de los géneros *Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Rothia*, *Streptococcus*, *Veillonella* (Kolenbrander y cols., 1985), permitiendo así el establecimiento de la biopelícula subgingival. Además, se ha demostrado que aumenta la secreción de citoquinas proinflamatorias, favorece la apoptosis de células epiteliales y altera la respuesta inmune del hospedero (Kang y cols., 2019; Signat y cols., 2011). *Veillonella parvula*, otra especie del “core”, utiliza como su principal fuente de carbono y energía el lactato que es generado principalmente por especies del género *Streptococcus*, y además se ha demostrado que facilita la coagregación de otras especies como *F. nucleatum in vitro* (Aas y cols., 2005). Finalmente, favorece el crecimiento y virulencia de *P. gingivalis* cuando ésta se

encuentra en baja densidad a través de la secreción de señales solubles (Hoare y cols., 2021).

Las especies asociadas a enfermedad como *P. gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus constellatus* y *Tannerella forsythia* (Figura 1), forman parte de comunidades compuestas fundamentalmente por especies anaerobias estrictas Gram negativo que producen factores de virulencia que favorecen la destrucción del periodonto de soporte. Dentro de estos factores de virulencia, *P. gingivalis* expresa gingipainas que son un grupo de endopeptidasas que le permiten obtener nutrientes a través de la degradación de proteínas, generando destrucción de la matriz colágena periodontal y del hueso alveolar, además de interferir en la respuesta inmune (Ly y Collyer, 2011). Lo anterior, sumado al estado de inflamación presente en los tejidos, favorece la presencia de productos de degradación de tejidos lo que finalmente favorece la colonización de otras especies patobiontes que perpetúan este estado inflamatorio y favorecen la progresión de la enfermedad (Hajishengallis y cols., 2012).

T. forsythia, por su parte, presenta una capa S que la recubre y protege de la respuesta inmune del hospedero, además favorece su adhesión a células y la colonización bacteriana, así como provoca apoptosis de linfocitos y leucocitos a través de la activación de caspasa 8 (Ramos-Perfecto, 2020). Más aún, ciertas especies encontradas en estado de periodontitis presentan un sinergismo aumentando la progresión y expresión de la enfermedad (Briceño y cols., 2009). *S. constellatus*, por su parte, se asocia a periodontitis refractarias (Colombo y cols., 1998), donde el tratamiento convencional no es capaz de restablecer la eubiosis. Finalmente, *P. endodontalis* produce colagenasas y proteasas, enzimas que ayudan en la destrucción de los tejidos de soporte y su abundancia es directamente proporcional con la presencia de *P. gingivalis* y *T. forsythia* en el saco periodontal (Lombardo y cols., 2012).

Así, debido a la relevancia de las interacciones inter bacterianas en el establecimiento de las comunidades asociadas a periodontitis, es necesario contar con modelos de estudios que consideren la diversidad de microorganismos encontrados en la enfermedad.

Modelos de estudio de comunidades subgingivales.

En la cavidad oral se presentan una gran variedad de microambientes, lo que permiten el establecimiento y modelación de diferentes comunidades, así, las comunidades se estructuran de tal forma que presentan predominio de ciertas especies de acuerdo a sus requerimientos nutricionales, disponibilidad de oxígeno, potencial redox, entre otros (Xu y cols., 2015; Aas y cols., 2005). Más aún, la cercanía entre estas especies en los distintos microambientes implica que en muchos casos su desarrollo depende de las interacciones específicas con especies vecinas, lo cual en ocasiones dificulta su monocultivo *in vitro* (He y cols., 2015). Peña y cols. (2007) encontraron que la disminución del potencial redox se debe a una acción sinérgica del componente aerobio de la comunidad que crea las condiciones necesarias para el establecimiento de bacterias anaerobias con mayor potencial de virulencia.

El desarrollo de modelos para el estudio de enfermedades polimicrobianas con enfoque de comunidad son claves para obtener resultados que consideren las interacciones interespecies. En periodontitis, tales modelos deben incluir especies representativas tanto de salud como de enfermedad, así como especies cuya proporción se mantiene en ambos estados, ya que las interacciones entre taxas de distintos grupos resultan clave en el establecimiento de la comunidad asociada a la enfermedad (Nazar, 2007). Además, de contar con elementos nutricionales y ambientales que reflejen la complejidad encontrada en la cavidad oral.

Se han desarrollado diferentes tipos de modelos de biopelículas *in vitro*, a partir de los cuales se ha establecido que el modelo ideal debería cumplir con las características señaladas en la Tabla 1 (Ansbro y cols., 2023).

Tabla 1: características ideales que debe cumplir un modelo de biopelícula *in vitro*.

Características deseadas de un modelo de biopelícula
Estandarizado
Reproducibile
Económico
Fácil de realizar
Que promueva el crecimiento de biopelículas
Que permita la modificación de las condiciones ambientales de la biopelícula de acuerdo a la pregunta de investigación que se quiera responder (por ejemplo, adición de agentes microbianos) además de pruebas comparativas entre las diferentes modificaciones realizadas
Que permita el crecimiento de múltiples especies y, por lo tanto, refleje la complejidad de biopelículas en la naturaleza
Que permita visualización directa y en tiempo real manteniendo el desarrollo de la comunidad.

Adicionalmente, para desarrollar estos modelos, hay factores críticos a considerar, como el tipo y tamaño de inóculo y el sistema de cultivo (Ansbrosi y cols., 2023).

Inóculos: como se mencionó anteriormente las interacciones bacterianas presentes en la biopelícula subgingival son complejas y extensas, los primeros estudios para conocer el desarrollo y progresión de periodontitis se basaban en modelos monoespecies que no representaban lo que realmente ocurre con la periodontitis (Prado y cols., 2020). No obstante, sirvieron para estudiar las características metabólicas de las especies analizadas (Lemos y cols., 2013). En la actualidad, se usan modelos multiespecies que han demostrado que las biopelículas mixtas muestran una mayor virulencia en comparación con los cultivos monoespecies

como resultado de la sinergia polimicrobiana entre los miembros de la comunidad (Ebersole y cols., 2017; Lamont y cols., 2018 y Prado y cols., 2020).

El origen de las especies inoculadas en la comunidad también es importante, pudiendo utilizar inóculos como saliva, o bien cepas de laboratorio (Fux y cols., 2005; Prado y cols., 2020). En el primer caso, existe varias desventajas, entre ellas: (i) la variabilidad del inóculo, ya que este puede no estar constituido por especies que se han considerado clave en la patogenia de la enfermedad, (ii) la cuantificación y composición de la muestra puede ser difícil de estimar y dependerá del donador, momento de obtención de la muestra, entre otros. Para solucionar estos inconvenientes se pueden utilizar cultivos obtenidos en laboratorio, ya que son estandarizados y permiten desarrollar comunidades de acuerdo con el objetivo del estudio. Además, permiten una buena reproducibilidad de las comunidades y una cuantificación de especies más simple. Una desventaja de estos inóculos es que se han descrito diferencias genómicas entre las cepas de referencia de laboratorio y las cepas clínicas, presentando estas últimas mayor plasticidad genómica y patogenicidad (Prado y cols., 2020).

Sistemas de cultivos: Estos se pueden clasificar como cerrados o abiertos dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, el primer caso los nutrientes se van agotando a medida que avanza el experimento, ejemplo de esto es el cultivo en placas de agar. En un sistema abierto, en cambio, existe la posibilidad de ir agregando nutrientes y eliminando desechos, generando un cultivo continuo, como el caso del quimiostato. Un quimiostato es un biorreactor en el que el caudal del afluente (medio fresco) es igual al caudal del efluente (productos metabólicos, microorganismos y nutrientes sobrantes), manteniendo así un volumen de cultivo constante donde se puede controlar el caudal y mantener una concentración de sustrato constante, así como proporcionar un control continuo del pH, la temperatura, los niveles de oxígeno, entre otros (Maier y Pepper, 2015).

Como mencionamos anteriormente, existen múltiples variables y métodos para realizar modelos de comunidad, por lo que el protocolo de modelo escogido por los investigadores dependerá ya sea del objetivo de la comunidad, como de las aplicaciones específicas y pregunta de investigación que se quieran realizar con el

modelo, además es necesario contar con todo los insumos e instrumental requerido por la comunidad, para de esta manera poder cumplir con los requerimientos necesarios de funcionamiento del modelo. En la literatura, existen publicaciones basadas en co-cultivos y modelos de comunidades bacterianas, alguno de los cuales se pueden observar en la Tabla 2, donde realizaron diferentes estudios con el objetivo de averiguar cómo influyen las comunidades tanto en el inicio, progresión y tratamiento de la periodontitis.

Tabla 2: Estudios realizados con enfoque de comunidad y sus resultados más relevantes.

Autor	Tipo de sistema	Especies	Resultados
Sánchez y cols. (2011)	Cerrado	<i>S. oralis</i> <i>A. naeslundii</i> <i>V. parvula</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. gingivalis</i> <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	La colonización de <i>Streptococcus oralis</i> y <i>Actinomyces naeslundii</i> precedieron al establecimiento de especies como <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> y <i>P. gingivalis</i> .
Romero-Lastra y cols. (2019)	Cerrado	<i>S. oralis</i> <i>A. naeslundii</i> , <i>V. parvula</i> , <i>F. nucleatuan</i> <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	El 19,1% del genoma de <i>P. gingivalis</i> se expresó diferente cuando se creció dentro de una biopelícula en comparación al cultivo planctónico.
El-Awady y cols. (2019)	Cerrado	<i>S. gordonii</i> , <i>F. nucleatum</i> <i>P. gingivalis</i>	Existe sinergismo entre las especies, lo que favorecía su diseminación y la respuesta inflamatoria en comparación al monocultivo.
Prado y cols. (2020)	Abierto	31 especies* <i>S. sanguinis</i> <i>S. gordonii</i> <i>A. naeslundii</i> <i>A. israelii</i>	Logra desarrollar una biopelícula estable a los 7 días con 24 especies de las seleccionadas inicialmente.

		<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. gingivalis</i>	
Hoare y cols. (2021)	Abierto	<i>P. gingivalis</i> <i>V. parvula</i>	La interacción específica entre <i>V. parvula</i> y <i>P. gingivalis</i> favorece el establecimiento de esta última incluso cuando se encuentra en baja densidad.
Ali y cols. (2021)	Cerrado	<i>F. nucleatum</i> <i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> reduce la producción de múltiples proteínas en presencia de <i>F. nucleatum</i> debido a las interacciones entre ambas bacterias.
Davies y cols. (2021)	Cerrado	<i>F. nucleatum</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>Parvimonas micra</i> <i>P. gingivalis</i>	Se observó que el crecimiento de la comunidad fue significativamente mayor a los 2 días en comparación al cultivo monoespecie y que esto fue facilitado por la expresión de gingipainas por parte de <i>P. gingivalis</i> .
Ghesquière y cols. (2023)	Abierto	<i>S. gordonii</i> <i>S. oralis</i> <i>S. sanguinis</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. gingivalis</i>	L-arginina inhibe el crecimiento y la incorporación de las especies patógenas y reduce el espesor y el volumen de la biopelícula.

*Para ver el listado completo de especies acceder a la referencia.

Considerando lo anterior, podemos señalar que se ha demostrado que la interacción tanto con especies asociadas a enfermedad como aquellas asociadas a salud modifican la virulencia de patobiontes y afectan la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la generación de comunidades polimicrobianas es clave para comprender tanto la etiología de la periodontitis como los mecanismos involucrados en la transición de salud periodontal a periodontitis como también posibles blancos terapéuticos.

Como se presentó anteriormente, existen diferentes métodos para establecer modelos de comunidades microbianas, la finalidad de este trabajo es construir una comunidad conformada por 9 especies bacterianas características del espacio subgingival. Para desarrollar este objetivo, la técnica más óptima sería utilizar un sistema de cultivo abierto que asegure que todas las especies, independiente de sus tasas de crecimiento individuales, tengan los nutrientes para desarrollarse correctamente (Gabriliska y cols., 2015). Lamentablemente esta tecnología presenta como desventaja su mayor costo, necesita personal capacitado para utilizarlo y no está disponible en nuestro laboratorio, por lo que en este estudio se propone generar una comunidad subgingival asociada a periodontitis *in vitro* en cultivo estático. Evaluaremos el comportamiento y crecimiento de cada una de las especies bacterianas que la constituyen, de manera de obtener una comunidad estable que, podrá ser utilizada en estudios de interacción microorganismo-célula en futuros trabajos de nuestro laboratorio. La comunidad propuesta estará compuesta por especies representativas de comunidades subgingivales humanas que fueron seleccionadas en base a su relevancia en el establecimiento de la comunidad asociada a la enfermedad y su factibilidad de crecimiento *in vitro*.

HIPÓTESIS.

De acuerdo con los antecedentes presentados, proponemos la siguiente hipótesis de trabajo:

Es posible establecer una comunidad subgingival polibacteriana asociada a periodontitis en un cultivo estático *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL.

Obtener una comunidad microbiana a partir de inóculos puros, en un sistema cerrado *in vitro* con especies bacterianas características de una comunidad subgingival de pacientes con periodontitis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Obtener monocultivos puros de bacterias subgingivales, estandarizando su crecimiento para desarrollar una comunidad bacteriana.
- 2) Generar una comunidad bacteriana de tipo subgingival asociada a periodontitis, evaluando el crecimiento de cada especie dentro de la comunidad bacteriana.

METODOLOGÍA.

Cepas Bacterianas: Se seleccionaron especies bacterianas representativas del área subgingival, considerando tanto aquellas mayormente asociadas a salud periodontal, periodontitis y, finalmente, especies del “core” que presentan la misma proporción en salud y enfermedad (Figura 1). Las cepas incluidas en la comunidad forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología e Inmunología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y se encuentran registradas en la Tabla 3.

Condiciones de cultivo: Cada cepa fue cultivada a 37°C en atmósfera aerobia, anaerobia o capnofílica, de acuerdo a los requerimientos atmosféricos de cada especie detallados en la Tabla 3. La atmósfera anaeróbica se logró mediante el uso de Oxoid AnaeroGen (Thermo Scientific™ Oxoid™ AnaeroJar™ 2.5 L). La atmósfera microaerofílica se realizó en jarra de anaerobiosis (jarra anaerobiosis Oxoid™) con vela. Las cepas se mantuvieron en cultivos sólidos en placas de agar y se crecieron en tubos de cultivos líquidos por los períodos de tiempo especificados en la Tabla 3, para obtener cultivos individuales que posteriormente fueron utilizados para generar la comunidad bacteriana. Todas las condiciones de crecimiento fueron previamente estandarizadas de acuerdo a las especificaciones de la “American Type Culture Collection” (ATCC), incluyendo ciertas modificaciones.

Tabla 3: Cepas, condiciones y medios de cultivos.

Especie	Cepa	Medio	Atmósfera	Periodo de incubación
<i>Actinomyces oris</i>	MG1	Caldo y agar BHI	anaeróbica	1 día
<i>Streptococcus gordonii</i>	ATCC10558	Caldo y agar TS	capnofílica	1-2 días
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i>	ATCC 25586	Caldo BHI + L-cisteína Agar BHI + L-cisteína + 5% de sangre de oveja	anaeróbica	1-2 días
<i>Veillonella parvula</i>	K1910	Caldo y agar BHI + L-cisteína + ácido láctico + hemina	anaeróbica	1 día
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	ATCC 35406	Caldo de BHI+ L-cisteína + hemina + menadiona Agar BHI+ L-cisteína + hemina + menadiona + 5% de sangre de oveja	anaeróbica	3-4 días
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	W83	Caldo de BHI+ L-cisteína + hemina + menadiona Agar BHI + L-cisteína + hemina + menadiona + 5% de sangre de oveja	anaeróbica	2-3 días
<i>Prevotella melaninogenica</i>	ATCC 258445	Caldo de BHI + L-cisteína + hemina + menadiona Agar BHI + L-cisteína + hemina + menadiona + 5% de sangre de oveja	anaeróbica	2-3 días
<i>Streptococcus constellatus</i>	SK-53, ATCC 27823	Caldo BHI Agar TS + 5% de sangre de oveja	anaeróbica	1 día
<i>Tannerella forsythia</i>	ATCC 43037	Caldo PY + suero de caballo + NAM	anaeróbica	10 días (caldo)

*BHI: infusión cerebro corazón; TS: Trypticasa de soya; PY: peptona-levadura, NAM: ácido N-acetil murámico. En verde, especies asociadas a salud gingival, en gris las pertenecientes al “core” y en rojo las especies presentes en mayor proporción en periodontitis.

Generación de comunidades polibacterianas *in vitro*: Se generaron inóculos estandarizados congelados de todas las especies antes mencionadas, de acuerdo a Hoare y cols. (2021). Para generar los inóculos congelados, todas las cepas se crecieron hasta fase logarítmica y luego se normalizaron con medio estéril hasta una densidad óptica a 600 nm (OD_{600})= 0,7. Los caldos normalizados se separaron en alícuotas de 1, 5 y 10 mL, obteniendo 5 alícuotas de cada volumen antes mencionado. Posteriormente, se centrifugaron a 400 x *g* por 15 minutos en tubos cónicos plásticos. El sobrenadante se eliminó cuidando de mantener los *pellets*, los cuales se suspendieron en 100, 100 y 200 μ L de medio de almacenamiento (medio para el microorganismo + 10% (vol:vol) glicerol), respectivamente y depositados mediante pipeta en tubos *Eppendorf*. Posteriormente, se rotularon con el nombre de la especie y el volumen de cultivo del cual provenían y se almacenaron en crioviales a -80°C, hasta la inoculación de la comunidad.

En el momento de la inoculación, se descongelaron rápidamente los criovales, sumergiendo los tubos en un baño a 37°C, a continuación, se inocularon en el medio de cultivo de la comunidad, el cual se basa en mucina y suero (modificado de Kinniment y cols., 1996), según se describió en Hoare y cols. (2021). El medio contenía mucina gástrica porcina 2,5mg mL⁻¹ (Sigma), KCL 2,5mg mL⁻¹, proteosa peptona 20mg mL⁻¹, extracto de levadura 1,0 mg mL⁻¹, tripticasa peptona 1,0 mg mL⁻¹, cisteína.HCL 1,0 μ g mL⁻¹, hemina 5 μ g mL⁻¹ y 10% l(vol:vol) suero equino inactivado por calor (Sigma).

Tanto el tamaño de inóculo y el volumen de medio de cultivo varió dependiendo del protocolo que se usó para generar la comunidad. En este trabajo se utilizaron 3 protocolos diferentes con el fin de establecer la mejor condición para el desarrollo de la comunidad, los diferentes protocolos utilizados se especifican en la Tabla 4.

Tabla 4: Protocolos usados para conformar las comunidades polimicrobianas.59

Comunidad	Inóculo usado	Vol. de inóculo (µL)										Vol. de medio (mL)	Días de toma de muestra	Observaciones
		Ao	Sg	Fn	Vp	Pe	Pg	Pm	Sc	Tf				
Protocolo 1	1 mL	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	0,1,2,3,4,7,10	1 réplica
Protocolo 2	1 mL	10	4	8	4	20	20	20	4	20	200	A) 0, 2, 4, 7, 11 y 14 B) 0, 4, 7, 10 y 14	duplicado (A y B)	
Protocolo 3	1 mL	10	4	8	4	20	20	20	4	20	200	0,3,7,11 y 14	cuadruplicado	

Una vez inoculadas las especies en la comunidad, se monitoreó su crecimiento y se tomó muestras diariamente entre los días 0 (t=0, inmediatamente después de la siembra) y día 14 (t=14, 14 días post inoculación). Las muestras se procesaron como se detalla a continuación.

Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC): Se realizaron recuentos de microorganismos críticos dentro de la comunidad con la capacidad de crecer en cultivo sólido (Hoare y cols., 2021). Brevemente, se tomaron alícuotas de 100 µL, se vortexearon y sonicaron 10 seg a 15% de amplitud (QSONICA modelo Q125), luego se realizaron placas con diluciones seriadas en los medios especificados a continuación. Medio BHI suplementado con 5% sangre desfibrinada, 0,04% L-cisteína, HCL 0,0025 g L⁻¹ de vancomicina para cuantificar *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica*, y *P. endodontalis*. Para cuantificar *A. oris* se utilizó agar selectivo para Actino que consiste en agar triptona de soya (TSA) suplementado con 0,5% glucosa, 0,0013% sulfato de cadmio, 0,008% fluoruro de sodio, 0,00012% acriflavina neutra y 0,000025% fucsina. Para cuantificar *S. constellatus* y *S. gordonii* se usó medio selectivo TYCs consistente en triptona 1,5%, extracto de levadura 0,5%, L-cisteína 0,02%, sulfato de sodio 0,01%, cloruro de sodio 0,1%, fosfato disódico (Na₂HPO₄) 0,2%, acetato de sodio 2%, sacarosa 5% y agar 1,5%.

Los datos se tabularon de manera cualitativa de acuerdo con las magnitudes obtenidas, los valores van de “+” cuando la magnitud es de 10^3 a “++++” cuando el valor llega a 10^6 . Si no se podía realizar un recuento exacto de la dilución ya sea por proximidad o sobreposición entre colonias se anotaron como incontable.

Cuantificación de especies bacterianas por qPCR: Se cuantificó la carga bacteriana total usando partidores específicos contra regiones conservadas del gen que codifica para el 16S rRNA (Tabla 5). Adicionalmente, se realizaron qPCR de genes específicos de todas las especies que conformaron la comunidad (*S. gordonii*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *V. parvula*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica*, *S. constellatus* y *T. forsythia*). El DNA se aisló según Abusleme y cols. (2013), para luego realizar los qPCR según las referencias indicadas en la Tabla 5, utilizando la química SYBR green. Para la determinación del número de copias de cada gen, se generaron curvas estándar usando los DNA genómicos respectivos. Las UFC estimadas fueron calculadas considerando el número de copias del gen respectivo por célula bacteriana.

Tabla 5: Partidores para la cuantificación de las especies bacterianas por qPCR.

Especie*	Secuencia (5'---> 3')	Genes objetivos	Referencias
<i>A. oris</i>	F:GAGAAGAAGTCCCTATCCATACC R:CTTCATGGGTTGGGATTTCT	<i>fimA</i>	Frias-Lopez, Duran-Pinedo 2012
<i>S. gordonii</i>	F: GGTGTTGTTTGACCCGTTTACG R: AGTCCATCCCACGAGCACAG	<i>non-coding región</i>	Morales y cols., 2016
<i>F. nucleatum subsp. nucleatum</i>	F: CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTC A R: TACTGAGGGAGATTATGTAAAAATC	<i>nusG</i>	Flanagan y cols., 2014
<i>V. parvula</i>	F:AAAGCCTTGGGCCATTCTCTGTTG R CCAAGGCCTCTTGTCTTGCATCA	<i>HMPREF 1035_1004</i>	Frias-Lopez, Duran-Pinedo, 2012
<i>P. endodontalis</i>	F:TATTGACAAGGCTGTGGCTACC R:TTCTTCGTCCCCATTAGCCGA	<i>hsp60</i>	Bordagaray y cols., 2021
<i>P. gingivalis</i>	F: AGGCAGCTTGCCATACTGCG R:ACTGTTAGTAACCTACCGATGT	<i>16s rRNA</i>	Sakamoto y cols., 2001
<i>P. melaninogenica</i>	F: TCTTGATAGCTCAGTTTCTTCAATC R:GCCTCAATCTCTGAGTGGCT	<i>ropB</i>	Zheng y cols., 2022
<i>S. constellatus</i>	F: CCAGACGGAACACAGTAGAC R: TCACGAACAGTATCCCAAAGG	<i>rpoB</i>	Park y cols., 20214
<i>T. forsythia</i>	F: AAAACAGGGGTTCCGCATGG R: TTCACCGCGGACTTAACAGC	<i>16S rRNA</i>	Fujise y cols., 2002
Carga bacteriana total	F: TCCTACGGGAGGCAGCAGT R: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	<i>16S rRNA universal</i>	Nadkarni y cols., 2002

*En verde, especies asociadas a salud gingival, en gris las pertenecientes al “core” y en rojo las especies presentes en mayor proporción en periodontitis.

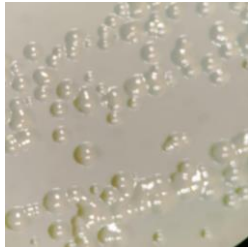
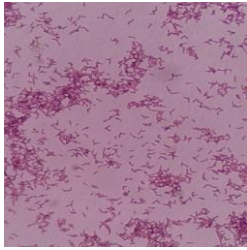

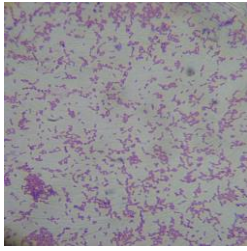
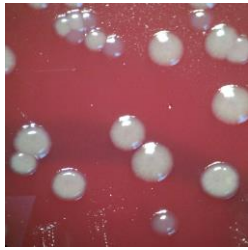
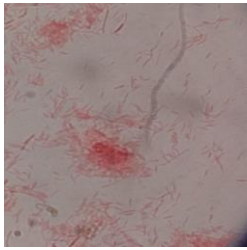

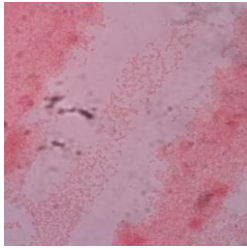
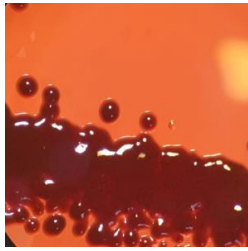
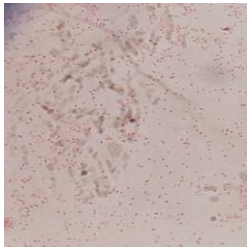
Análisis estadístico: Se realizaron análisis estadísticos para evaluar la reproducibilidad del protocolo seleccionado en esta Tesis. Adicionalmente, se verificó si existían diferencias en el crecimiento de cada una de las especies en la comunidad, así como de las especies agrupadas en: asociadas a periodontitis, del core y asociadas a salud. Para los análisis se utilizó el software PRISM (GraphPad). En primer lugar, se evaluó si había una distribución normal de los datos mediante el *test* Shapiro Wilk; utilizando test ANOVA para distribución normal y Kruskal-Wallis para datos no distribuidos normalmente. Para analizar las diferencias significativas, se utilizó el post-test de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias significativas se determinaron con un $p < 0,05$.

RESULTADOS

Generación de cultivos puros:

El primer paso para la obtención de la comunidad polimicrobiana *in vitro* propuesta en este trabajo, fue obtener cultivos de cada una de las especies individualmente. El objetivo fue obtener inóculos puros con distinta carga bacteriana para generar la comunidad, así como obtener *pellets* para realizar extracción de ADN y utilizarlos en las curvas estándar necesarias para la cuantificación de cada especie en la comunidad mediante qPCR.

Cada especie bacteriana fue cultivada según las condiciones señaladas en la Tabla 3. Para asegurar la pureza de cada cepa, se realizó un análisis macroscópico de las colonias obtenidas en cultivo sólido en placas de Petri mediante el uso de lupa estereoscópica y microscópico, utilizando tinción de Gram. Como es posible observar en la Figura 2, obtuvimos cultivos puros para cada una de las cepas a incluir en la comunidad.

Especie	Imagen macroscópica	Imagen microscópica
<i>A. oris</i>		
<i>S. gordonii</i>		
<i>F. nucleatum subsp. nucleatum</i>		
<i>V. párvula</i>		
<i>P. endodontalis</i>		

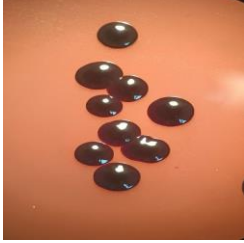
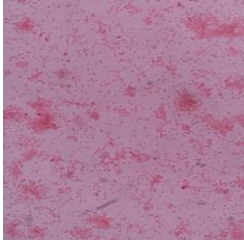
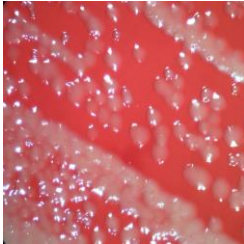
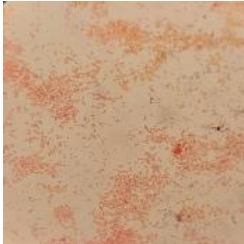
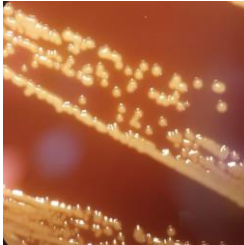
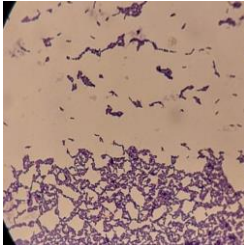
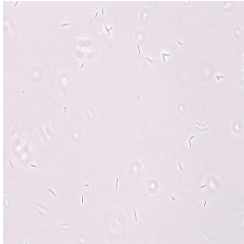
<i>P. gingivalis</i>		
<i>P. melaninogenica</i>		
<i>S. constellatus</i>		
<i>T. forsythia</i>	No corresponde	

Figura 2. Imágenes macroscópicas y microscópicas de las cepas incluidas en este estudio. Las imágenes de colonias fueron obtenidas con lupa estereoscópica (aumento final de 5X), mientras que las microscópicas son cultivos teñidos con Tinción de Gram, observados al microscopio óptico (aumento final de 1000X). Solo *T. forsythia* fue observada al fresco con un aumento final de 400X. No se realizó análisis macroscópico de *T. forsythia*, ya que no crece en cultivo sólido.

Una vez obtenidos los cultivos puros, se generaron los inóculos y *pellets* para aislamiento de ADN según se describió previamente. El número final de tubos obtenidos de cada cultivo se detalla en la Tabla 6. Como se observa, obtuvimos 5 tubos con 1 mL de cultivo ajustado a $OD_{600} = 0,7$, 5 con 5 mL del mismo cultivo y 5 con 10 mL del cultivo. Escogimos usar un rango amplio de volúmenes para

asegurarnos de contar con material suficiente para establecer las comunidades, probando distintas proporciones de las especies. Todos los tubos fueron congelados a -80°C en medio de cultivo con glicerol (proporción medio de cultivo: glicerol = 10:1) para asegurar la viabilidad de las especies. Los *pellets* para la obtención de ADN fueron procesados como se describe en Metodología.

Tabla 6: Lista de inóculos y *pellets* para extracción de ADN obtenidos en este estudio.

Especie	Número de inóculos de cada volumen de cultivo			Muestras para extracción de ADN
	1 mL	5 mL	10 mL	Número de <i>pellets</i>
<i>A. oris</i>	5	5	5	4
<i>S. gordonii</i>	5	5	5	4
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	5	5	5	4
<i>V. parvula</i>	5	5	5	4
<i>P. endodontalis</i>	5	5	5	4
<i>P. gingivalis</i>	5	5	5	4
<i>P. melaninogenica</i>	5	5	5	4
<i>S. constellatus</i>	5	5	5	4
<i>T. forsythia</i>	5	5	5	4

Generación de comunidades polimicrobianas.

En este trabajo, nos planteamos como objetivo generar una comunidad *in vitro* en un sistema cerrado que cumpliera los siguientes requisitos: (i) Incluir especies representativas de salud periodontal, del “core”, y asociadas a periodontitis, (ii) conseguir que todas las especies estuvieran representadas en el estado estacionario, (iii) observar una biomasa comparable de todas las especies incluidas. Con estos objetivos, generamos una serie de protocolos que difieren en el tamaño del inóculo incluido en la comunidad y en las condiciones de cultivo (Tabla 2). En todos los casos, se utilizaron las condiciones descritas en Metodología. Para la presentación de datos de recuentos en medios selectivos, lo realizaremos de forma cualitativa ya que los medios selectivos utilizados no son específicos para una determinada especie, por lo que el dato más relevante aportado por estos recuentos es la viabilidad bacteriana.

A continuación, se detallan los Protocolos utilizados:

Protocolo 1: establecimiento de una comunidad polimicrobiana con el mismo tamaño de inóculo por cada cepa.

La primera comunidad que establecimos consideró la utilización del mismo tamaño de inóculo para cada especie, basada en nuestro trabajo previo de ensamblaje de una comunidad en biorreactor (Hoare y cols., 2021). Mediante el uso de qPCR dirigido a genes específicos de cada especie (Tabla 3), se calculó el número estimado de UFC en el tiempo (Figura 3). Las especies *Ao*, *Vp* y *Fn* incrementaron su biomasa hasta el día 7 para luego entrar en estado estacionario. Mientras que *Pm* y *Sg* crecieron hasta el día 2 y luego se detuvo. *Pg*, *Sc* y *Pe*, por su parte, no crecieron en la comunidad; mientras *Pg* se mantuvo con la misma biomasa hasta el día 2, y luego descendió, *Sc* y *Pe* mostraron una caída hasta el día 2 y luego se mantuvieron con la misma biomasa. Finalmente, *Tf* mostró una caída hasta el día 4 luego un leve repunte hasta el día 10.

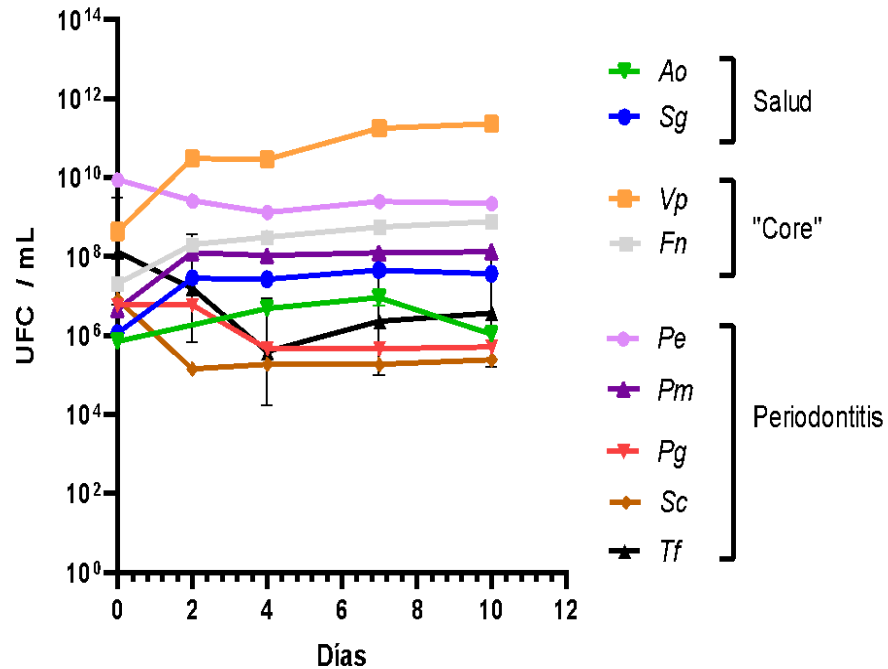


Figura 3. Cinética de crecimiento de especies incluidas en la comunidad asociada a periodontitis generada con el mismo tamaño de inóculo por cada cepa. Se muestra el cálculo de las unidades formadoras de colonias estimadas a partir de análisis por qPCR de cada especie.

Con el fin de confirmar que las especies incluidas en la comunidad estuvieran viables, se realizaron recuentos en los medios selectivos: Actino selectivo para *A. oris*, TYCs para *Streptococcus* spp. (*S. constellatus* y *S. gordonii*) y BHI suplementado con vancomicina para *P. gingivalis* + *P. endodontalis*, *F. nucleatum* y *P. melaninogenica*. En la Tabla 7 se observa que la comunidad establecida según el Protocolo 1 mostró crecimiento en BHI + vancomicina hasta el día 2, en los días 3 y 4 no se observan colonias, el día 7 se vuelve a observar crecimiento, pero menor al observado los días anteriores. En el medio Actino selectivo se obtuvieron recuentos viables a lo largo del tiempo, sin observar un aumento considerable en la biomasa. Finalmente, en TYCs se observó un aumento en el recuento viable hasta el día 2, luego de eso se mantuvo con una baja biomasa.

Tabla 7. Recuento de unidades formadoras de colonias en medios selectivos de muestras obtenidas de una comunidad generada con el mismo tamaño de inóculo por cada cepa.

Medio de cultivo	Días						
	T0	T1	T2	T3	T4	T7	T10
Vancomicina	++++	++++	++++	0	0	+++	+++
Actino	++	++	++	++	0	+++	+++
TYCs	+	+++	++++	+++	+++	+++	Incontable

+: 10^3 ; ++: 10^4 ; +++: 10^5 ; ++++: 10^6

Por lo tanto, este primer protocolo no nos permitió conseguir una comunidad en que todas las especies incluidas crecieron y se establecieron en el co-cultivo. A continuación, se realizaron ajustes orientados a cumplir nuestros objetivos.

Protocolo 2: establecimiento de una comunidad polimicrobiana con tamaños de inóculo calculados según la tasa de crecimiento de cada cepa.

Posteriormente, se realizó una nueva comunidad para la cual se calculó el tamaño de inóculos considerando la tasa de crecimiento de cada especie, de acuerdo a estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio (Hoare y cols., 2021), así se usó un mayor volumen para especies de crecimiento más lento y un volumen menor para especies de crecimiento más rápido (protocolo especificado en tabla 4).

La cuantificación por qPCR que se puede observar en la figura 4, mostró un aumento de *Tf* hasta el día 10, decayendo en tiempos posteriores. *Vp* y *Pg* crecieron hasta el día 7, mientras *Vp* entró en fase estacionaria, *Pg* mostró una leve disminución. En tanto, *Pm* creció hasta el día 4, y *Sg* y *Fn* mostraron un aumento el día 2 el que se mantuvo en el tiempo. Finalmente, *Pe*, *Ao* y *Sc* no crecieron en la comunidad. *Sc* particularmente, muestra un decaimiento sostenido en su biomasa

a tiempos tempranos. En conclusión, no se consiguió una comunidad con representación de todas las especies en la comunidad. Las especies de crecimiento más rápido se vieron mayormente afectadas sin lograr crecer en la comunidad.

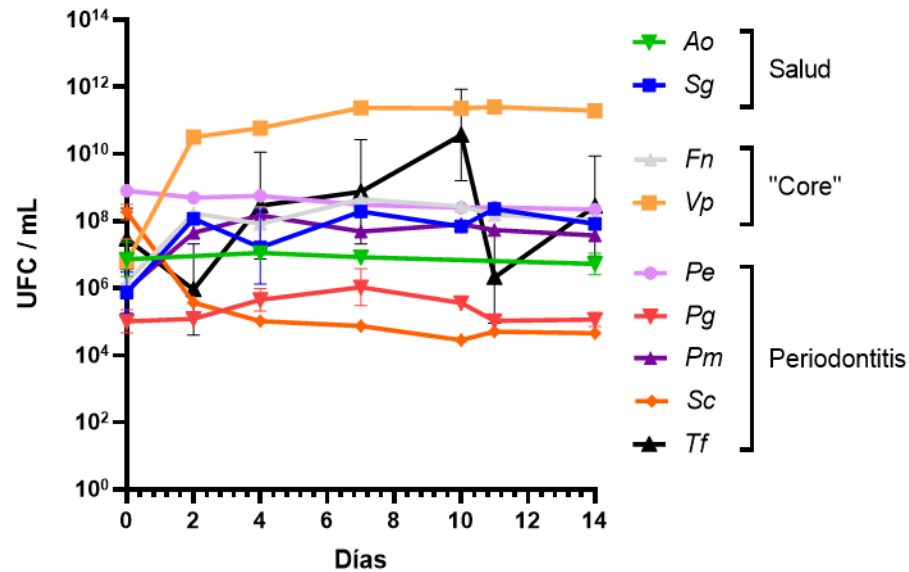


Figura 4. Cinética de crecimiento de especies incluidas en la comunidad asociada a periodontitis generada con tamaños de inóculo calculados según la tasa de crecimiento de cada cepa. Se muestra el cálculo de las unidades formadoras de colonias estimadas de 2 réplicas a partir de análisis por qPCR de cada especie.

El recuento de células viables en medios selectivos permitió comprobar si hubo crecimiento efectivo de las especies incluidas (Tabla 8). En TYCs se observó un aumento en las UFC/mL a medida que pasan los días en ambas réplicas de la comunidad. En medio actino selectivo, se observó un leve aumento a tiempos tempranos en ambas réplicas. No obstante, la réplica "B" se contaminó (dos morfologías coloniales y números inconsistentes), de manera que no debemos considerar esos resultados. En el medio BHI suplementado con vancomicina se observó un aumento aparente en los recuentos viables, sin embargo, se observaron dos morfologías, blanca y rojiza. Debido a que lo esperable es observar colonias negras (*Pg* y *Pe*) y blancas (*Fn* y *Pm*), probablemente las colonias rojas son consecuencia de la sobreposición de ambas morfologías coloniales. Considerar los

números obtenidos, en consecuencia, puede inducir a errores en la interpretación de los resultados.

Tabla 8. Recuento de unidades formadoras de colonias en medios selectivos de muestras obtenidas de una comunidad generada con tamaños de inóculo calculados según la tasa de crecimiento de cada cepa. Se observan los recuentos de las 2 réplicas realizadas.

Medio de cultivo	Réplica	Días			
		T0	T4	T7	T14
Vancomicina	A	++	Incontable*	++++	++++*
	B	+++*	Incontable	0	0
Actino	A	++	+++	0	++
	B	+	Contaminado	0	0
TYCs	A	+	Incontable	++++*	++++
	B	++	Incontable	++++	+

+: 10³; ++: 10⁴; +++: 10⁵; ++++: 10⁶; *se observaron 2 morfologías de colonias.

Protocolo 3: establecimiento de la una comunidad polimicrobiana con tamaños de inóculo calculados según la tasa de crecimiento de cada cepa y adición de medio fresco al momento de la toma de muestra.

Con los resultados obtenidos a partir de los protocolos 1 y 2, se realizó una nueva comunidad con el mismo volumen final y los mismos tamaños de inóculo que los usados en el protocolo 2, es decir con volúmenes estandarizados según la tasa de crecimiento. La novedad fue que, para evitar el agotamiento de nutrientes en el medio y asegurar el establecimiento de especies de alta y baja tasa de crecimiento, se adicionó medio fresco cada vez que se tomó una muestra de la comunidad.

El análisis de la comunidad por qPCR mostró (Figura 5) que las especies *Sg*, *Vp*,

Fn, *Sc*, *Pm*, *Tf* y *Pg* incrementaron su biomasa hasta el día 7, para luego disminuir levemente el día 11, a excepción de *Sc* que se mantiene constante; el día 14 la biomasa es equivalente al día 7. *Pe*, en tanto, no aumentó su biomasa en el tiempo, pero tampoco decayó considerablemente. El caso de *Ao* es particular, ya que, si bien se observa un incremento en su biomasa al día 3, su biomasa a lo largo del tiempo fue muy baja. Como se discutirá más adelante, esto probablemente se deba al método de extracción de DNA utilizado en este trabajo.

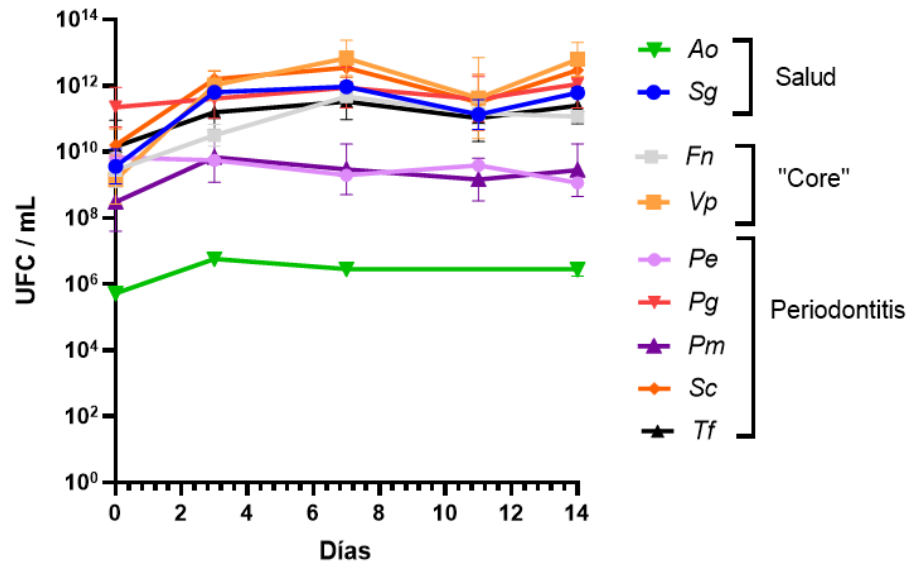


Figura 5. Cinética de crecimiento de especies incluidas en la comunidad asociada a periodontitis generada con tamaños de inóculo calculados según la tasa de crecimiento de cada cepa y adición de medio fresco al momento de la toma de muestra. Se muestra el cálculo de las unidades formadoras de colonias estimadas a partir de análisis por qPCR de cada especie de las 4 réplicas.

El paso siguiente fue evaluar el desarrollo de colonias viables a partir de estas comunidades. Para el caso de este protocolo, solo mostramos los resultados obtenidos de dos de las réplicas realizadas (Tabla 9). Se observa crecimiento en todos los medios selectivos durante los días de muestreo, a excepción de BHI vancomicina de la comunidad B, donde el día 14 no se observó colonias. En TYCs los días 0, 3 y 14 se observan 2 morfologías, una color crema y otra transparente, probablemente provenientes de las dos especies de *Streptococcus* incluidas en la

comunidad. En el caso de BHI suplementado con vancomicina también pudimos observar 2 morfologías, unas colonias rojas y otras blancas.

Tabla 9. Recuento de unidades formadoras de colonias en medios selectivos de muestras obtenidas de una comunidad generada con tamaños de inóculo calculados según la tasa de crecimiento de cada cepa y adición de medio fresco al momento de la toma de muestra. Solo se hizo recuento en medio selectivos de 2 (A y B) de las 4 réplicas.

Medio de cultivo	Días					
	Réplica	T0	T3	T7	T11	T14
Vancomicina	A	+++*	Incontable*	Incontable*	Incontable	Incontable
	B	+++	Incontable*	incontable	Incontable	0
Actino	A	+	+++	0	Incontable	+++
	B	+	++++	+++	+++	+++
TYCs	A	++*	Incontable*	++++	++++	Incontable*
	B	++*	Incontable*	++++	++++	Incontable*

+: 10^3 ; ++: 10^4 ; +++: 10^5 ; ++++: 10^6 ; *se observan 2 morfologías de colonias.

Con los resultados anteriores, es posible demostrar que mediante la aplicación del protocolo 3, conseguimos obtener una comunidad en que las especies incluidas se desarrollaron en el cultivo polimicrobiano. Este resultado fue consistente en las cuatro réplicas realizadas.

Caracterización de la comunidad asociada a periodontitis.

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales que nos permitieron obtener una comunidad que cumpliera con los requisitos planteados en este Trabajo de Investigación, evaluamos la carga bacteriana total a lo largo del tiempo, de manera de tener una visión más general de nuestra comunidad. En la Figura 6A se observa que la carga bacteriana total aumenta hasta el día 7 llegando a 1×10^{10} copias del gen 16S rRNA/mL. En el día 11, al igual que en el qPCR con marcadores genéticos especie-específico se presenta una leve disminución de recuentos, que no llega a ser significativa. Estos resultados son consistentes con la dinámica de crecimiento de las especies individuales reportado en la Figura 5.

A partir del análisis de la distribución de la biomasa bacteriana en el tiempo, consideramos los tiempos T7, T11 y T14 como estado estacionario de la comunidad, ya que se observa la formación de un *plateau* (Figura 6A). Con el fin de confirmar la reproducibilidad del protocolo seleccionado para establecer la comunidad subgingival, se calculó el promedio de la biomasa (números de copias del gen 16S rRNA en estado estacionario (T7, T11 y T14) en cada una de las cuatro réplicas del experimento y se realizó un análisis estadístico. En la Figura 6B se observa que no existen diferencias significativas entre las réplicas, por lo que el protocolo genera resultados reproducibles.

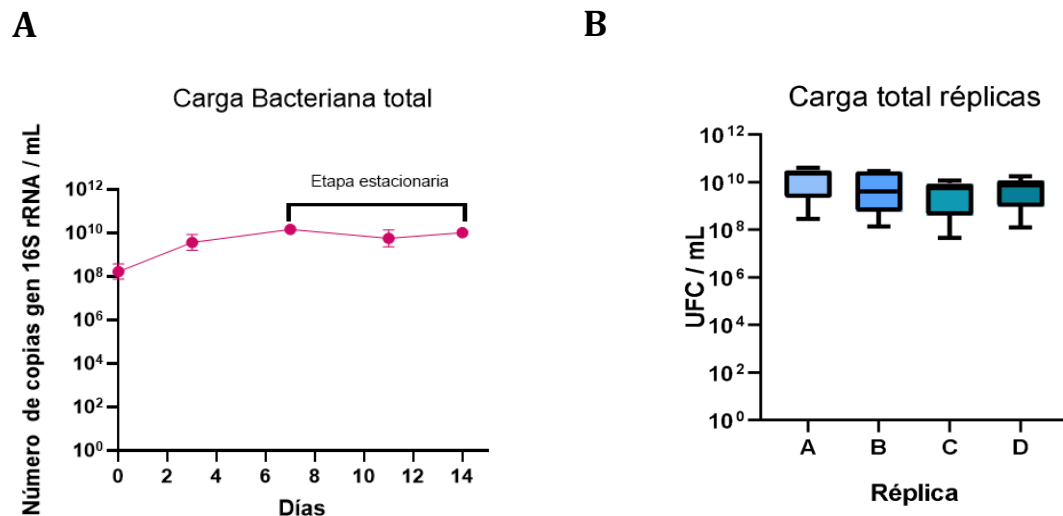


Figura 6: La biomasa bacteriana aumenta en el tiempo y es reproducible. (A) Se muestra el promedio y desviación estándar (DS) de la carga bacteriana total de las 4 réplicas de la comunidad, obtenida según el protocolo 3, medidas en el tiempo ($t=0$ a $t=14$) por qPCR; **(B)** se muestra el promedio de la carga bacteriana total en estado estacionario en cada réplica medidas en el tiempo.

A continuación, quisimos analizar las proporciones de cada una de las especies incluidas en la comunidad al llegar al estado estacionario, de manera de estimar cómo se distribuyen en la comunidad clímax. Para ello, calculamos la mediana de cada una de las especies en los tiempos T7, T11 y T14. En la Figura 7 se observa que todas las especies se encuentran representadas en la comunidad con medianas en el rango de UFC/mL de aproximadamente 1×10^9 y 1×10^{13} a excepción de *A. oris* que se encuentra subrepresentada.

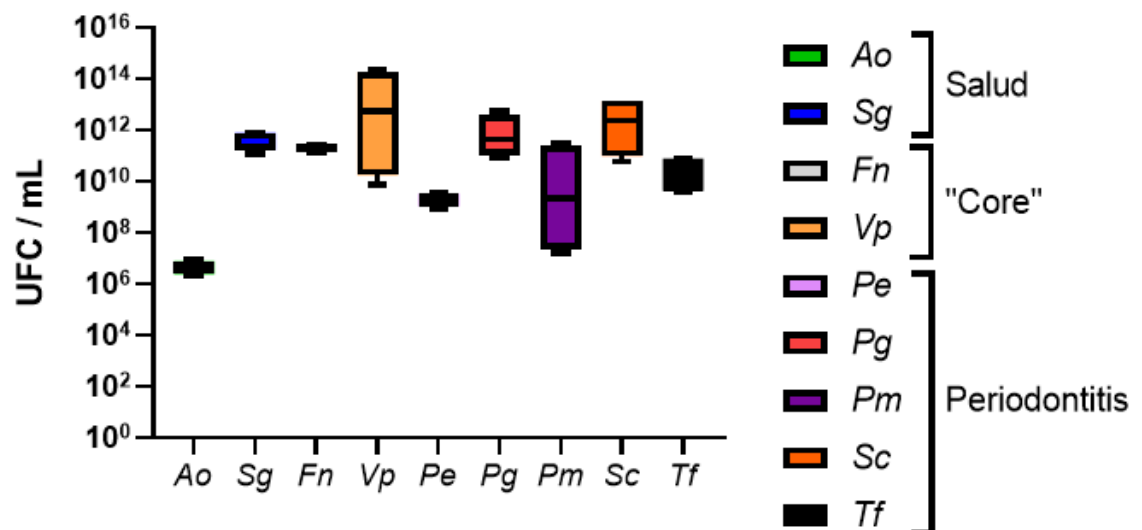


Figura 7: Mediana de las especies en estado estacionario varía de 10^6 a 10^{12} . Se muestra la mediana de UFC en cada especie en estado estacionario ($t=7$; $t=11$ y $t=14$).

Finalmente, con el objetivo de definir las proporciones de especies asociadas a salud periodontal, del "core" y asociadas a periodontitis en la comunidad clímax, calculamos el promedio de las especies correspondientes a cada uno de los tres grupos en estado estacionario (Figura 8). Se observa que sus UFC van desde 10^8

a 10^{11} , con una mayor representación aparente del grupo del “core” y la menor las especies asociadas a salud. No obstante, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Figura 8).

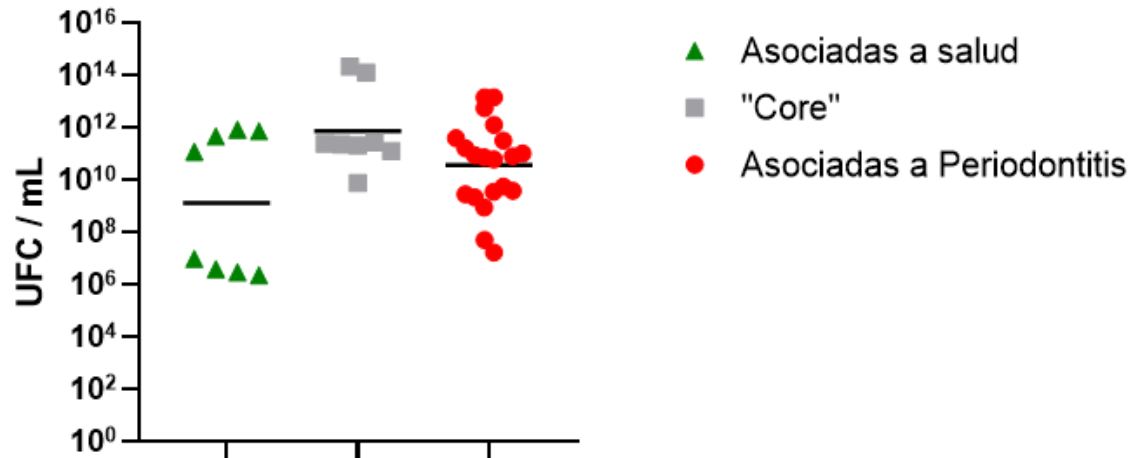


Figura 8: Se muestra el promedio y distribución de UFC de las especies agrupadas en las 3 categorías antes descritas (asociados a salud, “Core” y enfermedad). ($p > 0,05$).

Discusión

La generación de modelos de comunidades relacionadas a patologías polimicrobianas como la periodontitis, es clave tanto para responder preguntas sobre su etiopatogenia como probar potenciales tratamientos. Con el objetivo de conseguir un sistema de instalación simple en el laboratorio de Microbiología, generamos 3 protocolos diferentes en que inoculamos especies representativas de los tres grupos característicos de la microbiota subgingival: asociados a salud, del “core” y asociados a enfermedad (Figura 1). Inicialmente (protocolos 1 y 2), quisimos replicar un modelo en sistema cerrado previamente estandarizado en nuestro laboratorio (Hoare y cols., 2021), pero incluyendo más especies y ajustando los volúmenes de inoculación a esta nueva composición (Figuras 3 y 4). Como ya describimos en la sección de resultados, los qPCR dirigidos a marcadores específicos de cada especie, mostraron un crecimiento limitado de éstas, sobre todo de las asociadas a salud. Las comunidades alcanzaron su estado estacionario el día 2 para el protocolo 1 y el día 4 para el protocolo 2 aproximadamente. Lo anterior también se refleja en los recuentos de UFC en medios selectivos, donde se observa que el número de UFC se mantiene estable en el tiempo (Tablas 7 y 8). A partir de estos resultados, se puede especular que la disponibilidad de nutrientes podría estar limitando el crecimiento de la comunidad (Jakubovics, 2015). Lo anterior ocurre porque utilizamos un sistema cerrado, en que el medio de cultivo se agota rápidamente, impidiendo la maduración completa de la comunidad, desarrollándose de mejor manera las especies de crecimiento más rápido (asociadas a salud) (Zhu y cols., 2013). De hecho, una característica de estos sistemas es que hacen difícil realizar experimentos durante un largo período de tiempo, el cual es requerido para que se establezcan colonizadores más tardíos de la comunidad (especies asociadas a periodontitis) (Gabriliska y cols., 2015). La disponibilidad de nutrientes es fundamental para el desarrollo de la comunidad, sobre todo de los colonizadores tardíos de la biopelícula, por lo que para el protocolo 3 decidimos que cada vez que hiciéramos una toma de muestra, agregaríamos el mismo volumen retirado, pero de medio fresco. Con esta modificación, logramos “abrir” el sistema cerrado y conseguir que hubiese disponibilidad de nutrientes frescos a intervalos periódicos durante el curso del experimento. Así, obtuvimos mejores resultados dado que todas las

especies de la comunidad crecieron según nuestras determinaciones por qPCR (Figura 5).

Es importante destacar que la técnica de qPCR no permite discriminar entre bacterias vivas y muertas, ya que sólo detecta el ADN. Mediante el recuento de UFC, en cambio, podemos recuperar sólo aquellas bacterias viables (Tabla 9). Según estos recuentos, el número de UFC aumentaba conforme pasaban los días, es decir la adición de medio fresco nos permitió conseguir un aumento en las células viables, característica que no habíamos observado en los protocolos anteriores con un sistema cerrado estricto en que observamos una leve baja en los recuentos. Sumado a la adición de medio fresco, en el protocolo 3 se disminuyó los días de toma de muestras, lo que también puede favorecer el crecimiento de la comunidad, ya que las bacterias utilizadas son mayoritariamente anaeróbicas, por lo que la entrada de oxígeno al sistema durante cada toma podría perjudicar el crecimiento. En este sentido, Diaz y cols. (2002) observaron que se produjo una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular de *P. gingivalis* a medida que aumentaba la concentración de oxígeno. Por todo lo mencionado anteriormente, el protocolo número 3 cumplió con los objetivos propuestos de la presente tesis.

En las comunidades obtenidas a partir del sistema semi abierto conseguidas con el protocolo 3, se observó que las especies, a excepción de *Pe* aumentaron su biomasa hasta el día 2 y entraron a fase estacionaria el día 7. Sánchez y cols. (2011) describieron que biopelículas desarrolladas en medio estático alcanzaron su estado estacionario entre 72 y 96 h después de la inoculación. Asimismo, Prado y cols. (2020) no encontraron diferencias significativas en el recuento de UFC entre muestras recolectadas los días 3 y 7 de una biopelícula desarrollada en un sistema dinámico, similar a lo que ocurre con esta comunidad donde no se encontraron diferencias significativas entre las distintas especies a ningún tiempo de toma de muestra (Figura 7). Además, encontramos que *V. parvula* fue la especie que se encontraba más representada dentro de la comunidad, lo que concuerda con diversos estudios. Violant y cols. (2014) evaluaron la adhesión de biopelículas a diferentes tipos de implantes mediante la formación una biopelícula multiespecie compuesto por *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, *Veillonella parvula* ATCC

10790, *Streptococcus gordonii* ATCC 10558 y *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953. Entre los resultados se muestra que, en la composición de la biopelícula, la que presentaba mayor prevalencia era la especie *V. parvula*, luego *S. gordonii*, seguida de *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* (~10%) y, finalmente *A. naeslundii*. Esto tiene sentido si consideramos que *V. parvula* es crítica en el crecimiento de un patobionte clave de la periodontitis como es *P. gingivalis* (Hoare y cols., 2021).

El día 11 de toma de muestra se observó una disminución en los recuentos de UFC/mL, esto podría haber ocurrido por diversos factores entre los que están: no homogenizar el medio de la comunidad antes de recolectar la muestra, lo que nos da menos concentración de bacterias, ya que éstas podrían estar decantadas; error en el pipeteo que significó un menor volumen tomado o algún problema en la extracción de ADN. El día 14 los recuentos de UFC/mL son similares a los obtenidos el día 7.

Un aspecto relevante a discutir es que en la Figura 5 se observan bajos niveles del marcador genético de *A. oris*, determinados por qPCR. Lo anterior, podría explicarse debido al protocolo de extracción de ADN que se usó, ya que *A. oris* es una especie Gram positivo que puede presentar resistencia a las enzimas líticas (Schleifer y cols., 1972; Delisle y cols., 2006). En un estudio realizado por Díaz y cols. (2006) donde proceso muestras que contenían *Streptococcus gordonii* DL1 y *Actinomyces naeslundii* se encontraron secuencias de ambos genes solo cuando la muestra se calentó a 100°C durante 10 min, por lo que proyectamos modificar la técnica de extracción de ADN según Abusleme y cols. (2014). No obstante, ya que contamos con los recuentos de células viables en el medio selectivo actino (específico para el género), podemos asegurar que *A. oris* creció en la comunidad, llegando hasta 10⁶ UFC/mL al día 3 y decayendo un orden de magnitud al día 14.

Además del medio Actino selectivo, en este trabajo se usó un set de medios de cultivos selectivos para evaluar el desarrollo de células viables en el tiempo, lamentablemente solo el medio Actino selectivo es específico para una de las especies incluidas en la comunidad. Mientras que los medios TYCs y BHI vancomicina seleccionaron más de una especie, por lo tanto, solamente nos

permitieron tener números estimados de los recuentos viables. No obstante, el uso de estos medios de cultivo nos ayudó a evaluar la viabilidad de la comunidad en el tiempo y tener una visión general de cómo se desarrollaron las distintas especies. En el caso de BHI vancomicina, pudimos obtener una estimación del crecimiento de *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica* y *P. endodontalis*; TYCs, en tanto, es selectivo para *Streptococcus*, dándonos un estimado del crecimiento de *S. constellatus* y *S. gordonii*. Ésta fue la razón por la que se tomó la decisión de presentar estos datos de manera cualitativa ya que el número de UFC estimadas no se podría atribuir a una especie específica (Tablas 7, 8 y 9). En el medio BHI vancomicina se observaron 2 morfologías de colonias, unas color rojas y otras blancas, debido a que nuestro primer objetivo fue conseguir cultivos puros de las especies que iban a formar parte de la comunidad (Figura 2), pudimos deducir que las colonias de *P. melaninogenica*, *F. nucleatum* o *V. parvula* se observan de color blanco y las color café pigmentadas de negro, presumiblemente pueden corresponder a *P. gingivalis* o *P. endodontalis*.

Por lo tanto, debido a nuestra incapacidad de distinguir entre todas las especies en medios de cultivo, usamos qPCR con partidores específicos para cada una de las especies incluidas en la comunidad. El qPCR nos permitió hacer un análisis cuantitativo del crecimiento de éstas. Una desventaja del qPCR es que realiza amplificación del ADN bacteriano sin importar la viabilidad de las células, ya que el ADN se mantiene estable después de la muerte bacteriana, por lo que no puede discriminar entre bacterias vivas o muertas (Barbau-Piednoir y cols., 2014; Kralik y cols., 2017), esto es una limitación de este estudio, ya que no se contó con un método de verificación de viabilidad de cada una de las especies que compusieron la comunidad, por lo que no sabemos si la cuantificación presentada son de células viables. Existen diferentes métodos para poder determinar la viabilidad bacteriana. Una forma sería contar con medios de cultivos selectivos para todas las especies incluidas, donde logren desarrollarse hasta que se hagan visible, una desventaja es que en los medios selectivos las UFC de las especies pueden estar subrepresentados (Ammann y cols., 2013). También se han desarrollado diferentes técnicas para discriminar entre bacterias vivas y muertas en el qPCR, como lo es el uso del propidio de monoazida (PMA) o la monoazida de etidio (EMA) que son

moléculas intercaladoras de ADN que puede penetrar selectivamente en las células con la membrana celular dañada y formar enlaces covalentes estables de alta afinidad después de la exposición a la fotoactivación a una luz visible intensa (Nocker y cols., 2009). El enlace ADN-PMA inhibe la amplificación por qPCR por lo que se obtendrá un resultado más confiable, sin la sobreestimación del número de las UFC viables. Sánchez y cols. (2014) determinaron que el PMA es eficaz para diferenciar células viables y muertas de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*. Álvarez y cols. (2013) demostraron que esta metodología es adecuada para cuantificar las células vivas y muertas presentes en una biopelícula oral multiespecie. Finalmente, Serety y cols. (2021) encontraron que el uso de PMA junto con el qPCR puede entregar información más certera respecto a la carga bacteriana viable y la respuesta al tratamiento periodontal. Comparando los dos colorantes, el PMA tiene la ventaja sobre el EMA de ser más selectivo para las células muertas (Nocker y cols., 2006; Flekna y cols., 2007; Cawthorn y Witthuhn, 2008).

Otra opción de ver viabilidad bacteriana es a través del uso de microscopía confocal junto a un kit de viabilidad bacteriana, como lo es el kit LIVE/DEAD™ BacLight™ el cual cuenta con 2 tinciones, el primero es el SYTO 9™ el cual penetra todas las membranas bacterianas sin distinción marcando las bacterias con un color verde. El segundo colorante es el yoduro de propidio que tiene afinidad con las membranas dañadas, lo cual provoca una reducción de la fluorescencia de la tinción SYTO dejando las bacterias que no presentan viabilidad marcadas de color rojo. Sánchez y cols. (2011) a través de este método determinó que la viabilidad bacteriana posterior a 168 horas de incubación era del 23,7% en un modelo de biopelícula estática.

Con todo lo anterior, consideramos adecuado repetir el protocolo semi abierto para la construcción de una comunidad tipo subgingival, incluyendo algún test de viabilidad de las células, probablemente qPCR asociado a PMA o EMA para asegurarnos de la viabilidad de todas las especies incluidas. Con una comunidad con los controles necesarios, la potencialidad de usarla en distintas investigaciones es muy grande. Ya que hemos conseguido estandarizar un modelo fácilmente

realizable en un laboratorio de microbiología.

CONCLUSION

Se estandarizó un protocolo para la obtención de una comunidad asociada a periodontitis con representación de los 3 grupos de bacterias subgingivales (salud, “core” y asociadas a periodontitis), fácilmente montable en el laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aas J, Paster B, Stokes L, Olsen I, Dewhirst F. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.*; 43:5721–5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.

Abusleme L, Hoare A, Hong B, Diaz P. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000*. Mar ;86(1):57-78. doi: 10.1111/prd.12362.

Abusleme L, Hong BY, Dupuy AK, Strausbaugh LD, Diaz PI. (2014). Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *J Oral Microbiol*. Apr 23;6. doi: 10.3402/jom.v6.23990.

Abusleme L, Dupuy A, Dutzan N, Silva N, Burleson J y cols. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*. 7(5), 1016–1025. doi: 10.1038/ismej.2012.174.

Ali Mohammed M, Pettersen V, Nerland A, Wiker H, Bakken V. (2021). Label-free quantitative proteomic analysis of the oral bacteria *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* to identify protein features relevant in biofilm formation. *Anaerobe*. Dec;72:102449. doi: 10.1016/j.anaerobe.2021.102449.

Alvarez G, González M, Isabal S, Blanc V, León R. (2013). Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express*. Jan 4;3(1):1. doi: 10.1186/2191-0855-3-1.

Ammann TW, Bostanci N, Belibasakis GN, Thurnheer T. (2013). Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res*. Aug;48(4):517-26. doi: 10.1111/jre.12034.

Ansbro, K., Farrugia, C., Stafford, G.P., Shepherd, J. (2023). Polymicrobial Biofilm Models: The Case of Periodontal Disease as an Example. *Multispecies Biofilms*, Springer Series on Biofilms, vol 12. ISBN : 978-3-031-15348-8.

Arweiler N, Netuschil L. (2006). The Oral Microbiota. *Adv Exp Med Biol.* 902:45-60. doi: 10.1007/978-3-319-31248-4_4.

Baker JL, Mark Welch JL, Kauffman KM, McLean JS, He X. (2024). The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. *Nat Rev Microbiol.* Feb;22(2):89-104. doi: 10.1038/s41579-023-00963-6.

Barbau-Piednoir E, Mahillon J, Pillyser J, Coucke W, Roosens NH, Botteldoorn N. (2014). Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella serovar Enteritidis*. *J Microbiol Methods.* Aug;103:131-7. doi: 10.1016/j.mimet.2014.06.003.

Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, Alipour V y cols. (2020). Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J Dent Res.* Apr;99(4):362-373. doi: 10.1177/0022034520908533.

Bradshaw D. (1989). The use of defined inocula stored in liquid nitrogen for mixed culture chemostat studies. Volume 9, Issue 2, Pages 123-128. ISSN 0167-7012.

Briceño C, Elsi C, Perrone C. (2009). Nuevas especies del género *Prevotella* y su importancia en el área odontológica: Revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana.* 47(4), 167-173.

Bordagaray M, Fernández A, Garrido M, Astorga J, Hoare A, Hernández M. (2021). Systemic and Extraradicular Bacterial Translocation in Apical Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 19;11:649925. doi: 10.3389/fcimb.2021.649925.

Carvajal P. (2016). Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* [online]. Vol.9, n.2. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.001>.

Caton J, Armitage G, Berglundh T y cols. (2018). A new classification scheme for periodontal and periimplant diseases and conditions: Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 45, S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935.

Colombo A, Haffajee A, Dewhirst F, Paster B, Smith C y cols. (1998). Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* 25(2), 169–180. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02424.x.

Cook G, Costerton J, Lamont RJ. (1998). Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *J Periodontal Res.* 33(6):323-7. doi: 10.1111/j.1600-0765.1998.tb02206.x.

Davies J, Kad T, Neilands J, Kinnby B, Prgomet Z y cols. (2021). Polymicrobial synergy stimulates *Porphyromonas gingivalis* survival and gingipain expression in a multi-species subgingival community. *BMC Oral Health.* Dec 15;21(1):639. doi: 10.1186/s12903-021-01971-9.

Delisle AL, Barcak GJ, Guo M. (2006). Isolation and expression of the lysis genes of *Actinomyces naeslundii* phage Av-1. *Appl Environ Microbiol.* Feb;72(2):1110-7. doi: 10.1128/AEM.72.2.1110-1117.2006..

Diaz P, Hoare A, Hong B. (2016). Subgingival microbiome shifts and community dynamics in periodontal diseases. *CDA Journal.* Jul;44(7):421-35. PMID: 27514154.

Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr y cols. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial

colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol.* Apr;72(4):2837-48. doi: 10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006.

Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. (2002). *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology (Reading)*. Feb;148(Pt 2):467-472. doi: 10.1099/00221287-148-2-467.

Donlan R, Costerton J. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* Apr;15(2):167-93. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

El-Awady A, de Sousa Rabelo M, Meghil M, Rajendran M, Elashiry M y cols. (2019). Polymicrobial synergy within oral biofilm promotes invasion of dendritic cells and survival of consortia members. *npj Biofilms Microbiomes.* 5, 11. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0084-7>.

Flanagan L, Schmid J, Ebert M, Soucek P, Kunicka T y cols. (2014). *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Aug;33(8):1381-90. doi: 10.1007/s10096-014-2081-3.

Frias-Lopez J, Duran-Pinedo A. (2012). Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J Bacteriol.* Apr;194(8):2082-95. doi: 10.1128/JB.06328-11.

Fujise O, Hamachi T, Inoue K, Miura M, Maeda K. (2002). Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. *J. Periodontol.* Nov;73(11):1253-9. doi: 10.1902/jop.2002.73.11.1253.

Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW. (2005). Can laboratory reference strains mirror “real-world” pathogenesis? Trends Microbiol. Feb;13(2):58-63. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.001.

Gabrilska RA, Rumbaugh KP. (2015). Biofilm models of polymicrobial infection. Future Microbiol. 10(12):1997-2015. doi: 10.2217/fmb.15.109.

Ghesquière J, Simoens K, Koos E, Boon N, Teughels W, Bernaerts K. (2023). Spatiotemporal monitoring of a periodontal multispecies biofilm model: demonstration of prebiotic treatment responses. Appl Environ Microbiol. Oct 31;89(10):e0108123. doi: 10.1128/aem.01081-23.

Hajishengallis G, Darveau R, Curtis M. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. Nat rev Microbio. Oct;10(10):717-25. doi: 10.1038/nrmicro2873.

Han Y. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. Curr Opin Microbiol. Feb;23:141-7. doi: 10.1016/j.mib.2014.11.013.

He J, Li Y, Cao Y y cols. (2015). The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. Folia Microbiol (Praha). Jan;60(1):69-80. doi: 10.1007/s12223-014-0342-2.

Herrera D, Meyle J, Renvert S, Jin L. (2018). White paper on prevention and management of periodontal diseases for oral health and general health. Disponible en: <https://www.fdiworldddental.org/resource/white-paper-prevention-and-management-periodontal-diseases-oral-health-and-general-health>.

Hoare A, Wang H, Meethil A, Abusleme L, Hong BY y cols. (2021). A cross-species interaction with a symbiotic commensal enables cell-density-dependent growth and in vivo virulence of an oral pathogen. ISME J. May;15(5):1490-1504. doi: 10.1038/s41396-020-00865-y.

Organización Mundial de la Salud. (2022). Informe sobre la situación mundial de la salud bucodental: hacia la cobertura sanitaria universal para la salud bucodental de aquí a 2030. Resumen ejecutivo [Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Executive summary]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2022. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Jakubovics NS. (2015). Saliva as the Sole Nutritional Source in the Development of Multispecies Communities in Dental Plaque. *Microbiol Spectr.* 2015 Jun;3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0013-2014.

Kang W, Jia Z, Tang D, Zhang Z, Gao H, He K y cols. (2019). *Fusobacterium nucleatum* Facilitates Apoptosis, ROS Generation, and Inflammatory Cytokine Production by Activating AKT/MAPK and NF- κ B Signaling Pathways in Human Gingival Fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev.* Oct 13;2019:1681972. doi: 10.1155/2019/1681972.

Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res.* 2014 Nov;93(11):1045-53. doi: 10.1177/0022034514552491.

Kinniment S, Wimpenny J, Adams D, Marsh P. (1996). Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. *Microbiology (Reading, England).* 142(Pt 3), 631–638. doi: 10.1099/13500872-142-3-631.

Kolenbrander P, Anderson R, Holdeman L. (1985). Coaggregation of oral Bacteroides species and other bacteria: central role in coaggregation bridges and competitions. *Infect. Immun.* Jun;48(3):741-6. doi: 10.1128/iai.48.3.741-746.1985.

Konkel, J. E., O'Boyle, C., & Krishnan, S. (2019). Distal Consequences of Oral Inflammation. *Front Immunol.* Jun 25;10:1403. doi: 10.3389/fimmu.2019.01403.

Kralik P, Ricchi M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol.* Feb 2;8:108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.

Kwon T, Lamster I, Levin L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *Int Dent J.* Dec;71(6):462-476. doi: 10.1111/idj.12630.

Lemos JA, Quivey RG, Koo H, Abranches J. (2013). *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm?. *Microbiology (Reading).* Mar;159(Pt 3):436-445. doi: 10.1099/mic.0.066134-0.

Li N, Collyer C. (2011). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* - Complex domain structures confer diverse functions. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* Mar;1(1):41-58. doi: 10.1556/EuJMI.1.2011.1.7.

Lombardo Bedran T, Marcantonio R, Spin Neto R, Alves Mayer MP, Grenier D y cols. (2012). *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study. *J Oral Microbiol.* 2012;4. doi: 10.3402/jom.v4i0.10123.

Méndez J, Armesto W. (2008). Enfermedad periodontal y embarazo: (Revisión bibliográfica). *Rev haban cienc méd* [Internet]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2008000100006&lng=es.

Morales A, Jara G, Werlinger F, Cabello R, Espinoza I y cols. (2020). Sinopsis de la Situación de Salud Oral en Chile - Parte II: Diagnósticos Poblacionales de Salud Oral. *International journal of interdisciplinary dentistry*, 13(2), 88-94. <http://dx.doi.org/10.4067/S2452-55882020000200088>

Morales V, Palma P, Yevenes I, Corsini G,. (2016). Recuento de *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus mutans* en muestras de saliva y placa bacteriana supragingival de niños escolares de 6 y 7 años de edad con

diferente actividad cariogénica. Trabajo de investigación requisito para optar al título de cirujano dentista. repositorio Uchile.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology (Reading)*. Jan;148(Pt 1):257-266. doi: 10.1099/00221287-148-1-257.

Nazar C. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello [Internet]*. 67(1): 161-172. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>.

Nocker A, Mazza A, Masson L, Camper AK, Brousseau R. (2009) Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods*. Mar;76(3):253-61. doi: 10.1016/j.mimet.2008.11.004.

Nocker A., Cheung C.Y., Camper A.K.. (2006). Comparison of propidium monoazide and ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods*. Nov;67(2):310-20. doi: 10.1016/j.mimet.2006.04.015.

Nogva H.K., Dromtorp S.M., Nissen H., Rudi K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*. Apr;34(4):804-8, 810, 812-3. doi: 10.2144/03344rr02.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH y cols. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. Jun;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.

Park, SN., Lim, Y.K. & Kook, JK. (2014). Development of species-specific quantitative real-time PCR primers for detecting anginosus group streptococci based on the rpoB . *Arch Microbiol*. Sep;196(9):661-6. doi: 10.1007/s00203-014-1007-x.

Peña T, Delgado A, Martínez Y. (2007). Nociones actuales sobre la flora microbiana del surco gingival. *Revista Cubana de Estomatología*, 44(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072007000300012&lng=es.

Prado MM, Kovalski DJ, Torrez WB, Bueno-Silva B, Feres M, de Almeida J y cols. (2020). Development of a multispecies periodontal biofilm model within a stirred bioreactor. *Biofouling*. Jul;36(6):725-735. doi: 10.1080/08927014.2020.1805600.

Prado MM, Figueiredo N, Pimenta AL, Miranda TS, Feres M y cols. (2022). Recent Updates on Microbial Biofilms in Periodontitis: An Analysis of In Vitro Biofilm Models. *Adv Exp Med Biol*. 1373:159-174. doi: 10.1007/978-3-030-96881-6_8.

Raina M. Maier, Ian L. Pepper. (2015). Chapter 3 - Bacterial Growth. *Environmental Microbiology (Third Edition)*, Academic Press, Pages 37-56.

Ramos-Perfecto D. (2020). *Tannerella forsythia*: patógeno importante en la periodontitis, integrante del complejo rojo. *Odontol Sanmarquina*. 23(3)2020-08-04.

Rojas J, Rojas L, Hidalgo R. (2014). Tabaquismo y su efecto en los tejidos periodontales. *Rev clín de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 7(2), 108-113. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072014000200010>.

Romero-Lastra P, Sánchez M, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, Sanz M. (2019). Gene expression of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 when growing in an in vitro multispecies biofilm. *PLoS One*. Aug 22;14(8):e0221234. doi: 1371/journal.pone.0221234.

Rudi K., Naterstad K., Drømtorp S.M., Holo H. (2005). Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*. 2005;40(4):301-6. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01672.x.

Saito A, Inagaki S, Kimizuka R, Okuda K, Hosaka Y y cols. (2008). *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunol Med Microbiol. Dec;54(3):349-55. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00481.x.

Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. (2001). Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol Immunol. 45(1):39-44. doi: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb01272.x.

Sakanaka A, Kuboniwa M, Shimma S, Alghamdi S, Mayumi S y cols. (2022). *Fusobacterium nucleatum* metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms. mSystems. Aug 30;7(4):e0017022. doi: 10.1128/msystems.00170-22.

Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, León R, Blanc V y cols. (2014). Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. J Periodontal Res. Feb;49(1):20-8. doi: 10.1111/jre.12073.

Sánchez M, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D y cols. (2011). Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. J Periodontal Res. Apr;46(2):252-60. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01341.x.

Sarduy L, González M. (2016). La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. Medicentro Electrónica, 20(3), 167-175. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432016000300002&lng=es.

Schleifer KH, Kandler O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol Rev. Dec;36(4):407-77. doi: 10.1128/br.36.4.407-477.1972.

Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. (2011). *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol.* 13(2):25-36. PMID: 21220789.

Sereti M, Zekeridou A, Cancela J, Mombelli A, Giannopoulou C. (2021). Microbiological testing of clinical samples before and after periodontal treatment. A comparative methodological study between real-time PCR and real-time-PCR associated to propidium monoazide. *Clin Exp Dent Res.* Dec;7(6):1069-1079. doi: 10.1002/cre2.464.

Violant D, Galofré M, Nart J, Teles RP. (2014). In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm on different implant surfaces. *Biomed Mater.* Jun;9(3):035007. doi: 10.1088/1748-6041/9/3/035007.

Xu X, He J, Xue J, Wang Y, Li K, y cols. (20015). Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol.* 17:699–710. doi: 10.1111/1462-2920.12502.

Zhu Y, Dashper SG, Chen YY, Crawford S, Slakeski N y cols. (2013). *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* synergistic polymicrobial biofilm development. *PLoS One.* Aug 26;8(8):e71727. doi: 10.1371/journal.pone.0071727.