

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III (MEDICINA Y CIRUGÍA BUCOFACIAL)



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo y validación de un modelo *in vitro* de biopelícula oral**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**María del Carmen Sánchez Beltrán**

Directores

Mariano Sanz Alonso  
David Herrera González

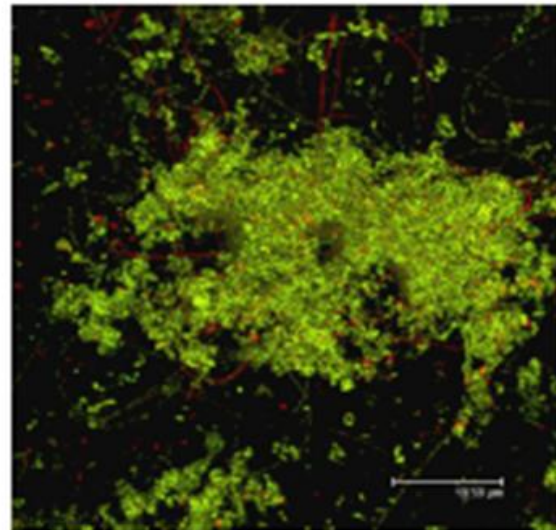
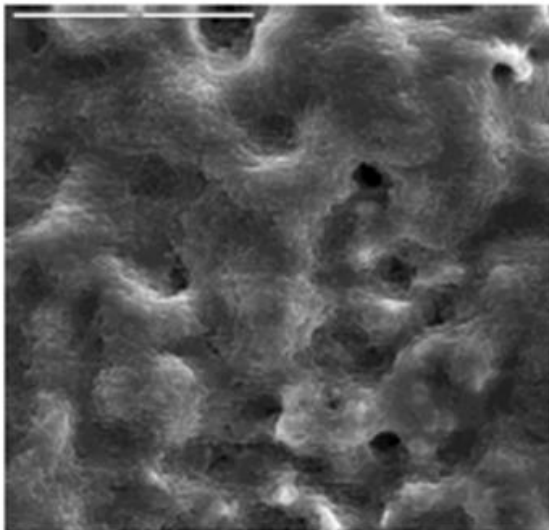
**Madrid, 2014**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III



## DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO *IN VITRO* DE BIOPELÍCULA ORAL

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por  
**Dña. María del Carmen Sánchez Beltrán**

Directores

**Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso**  
**Prof. Dr. D. David Herrera González**

Madrid, 2013



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

Departamento de Estomatología III



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO *IN VITRO* DE  
BIOPELÍCULA ORAL**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

**Dña. María del Carmen Sánchez Beltrán**

Directores

**Prof. Dr.D. Mariano Sanz Alonso**

**Prof. Dr.D. David Herrera González**

**Madrid, 2013**



**Esta tesis Doctoral ha sido posible gracias a:**

- Proyecto de investigación por convenio según Artículo 83 LOU, entre la Universidad Complutense de Madrid y DENTAID 289/2007. Perfeccionamiento del modelo de biopelícula oral y su utilización en la valoración y elaboración de compuestos antisépticos dirigidos hacia la prevención de enfermedades bucales.
- Proyecto de investigación por convenio según Artículo 83 LOU, entre la Universidad Complutense de Madrid y DENTAID 332/2011. Formación de biopelículas orales sobre superficies de implantes dentales.



*Con mucho cariño a mis padres Javier y Asun, a mi marido Javi y a mi hija Cristina, por apoyarme día a día.*



*“E pluribus unum”*. De muchos, uno.

Virgilio. *Moretum*.



## Agradecimientos

El llevar adelante una tesis doctoral sin duda lleva mucho trabajo y dedicación. Al llegar al final de esta etapa y mirar hacia atrás, quiero agradecer a todas las personas que han compartido conmigo este camino.

Lo primero, quiero dar las gracias a mis directores, el Dr. Mariano Sanz y Dr. David Herrera, por darme la oportunidad de adentrarme en un mundo que hasta entonces desconocía. Gracias por confiar en mí, por vuestra accesibilidad en todo momento y por vuestro trato cariñoso y sereno. Su apoyo incondicional ha sido fundamental para que este proyecto haya visto la luz.

Gracias al Dr. José Antonio Ramos, por “seleccionarme” entre los candidatos que nos presentamos para desarrollar la tan ansiada “boca artificial”, que no sabía ni como imaginármela, y que ahora me apasiona.

Gracias a los laboratorios DENTAID S.A., que han posibilitado el desarrollo de esta tesis. Al Dr. Rubén León y Dra. Vanessa Blanc, gracias por recibirme en Barcelona con los brazos abiertos y enseñarme tantas cosas de las bacterias orales, qué tanto nos hacen sufrir. Igualmente gracias por vuestra amistad y por confiar en el equipo del que formo parte para colaborar juntos en tantos proyectos.

Esta tesis no habría sido posible sin la Dra. Arancha Llama-Palacios, ya que por su generosidad estoy aquí. Ella me recomendó en su propia entrevista para el mismo puesto. Si eso no es amistad, que me lo digan. Y aquí estamos las dos, mano a mano, luchando por sacar adelante cualquier reto que se nos plantea. Gracias Arancha por ser tan buena compañera, tan cariñosa, tan paciente, en definitiva, tan buena amiga.

Qué decir del “dream-team” del laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la UCM. A la Dra. Itziar González, Ana O’Connor, Conchita García-Patos y Lola Asensio, gracias por vuestra acogida, por vuestra amistad, por vuestro apoyo, por vuestra ayuda incondicional, por las risas que pasamos en cualquier momento, por todo. Soy una privilegiada, pues cada día tengo ganas de ir a trabajar en parte por vosotras, no se puede desear mejores compañeras.

El resto del equipo de investigación no se queda atrás; gracias a todos mis compañeros, a los que han estado y están, que durante este tiempo han tenido que aguantarme, y porque siempre me han ayudado y apoyado. Gracias a la Dra. Maria José Marín, por su amistad, por su generosidad, porque nunca pierde la sonrisa, por su ayuda y dedicación, porque no se puede ser mejor persona. Dra. Elena Figuro, tú haces que las demás queramos ser más perfeccionistas, nos haces mejores, y ¡como manejas la estadística! Muchas gracias por todo lo que me has ayudado, y por explicarme esa parte clínica que no controlo. Milena Z, Simone F, Andrea B, María M, Estefanía L, Nagore A, Leire V, Eva F, porque es un placer trabajar con vosotros codo con codo.

También quiero dar las gracias a Carmen Roiz, a Rosa Simón y Elena Gimenez. Gracias por vuestro cariño, por las charlas a la hora del café y de la sobremesa. Mamen, gracias por tu eficacia y por cómo siempre estas preocupándote de nosotras y de nuestros asuntos laborables, solucionando hasta lo que parece imposible.

Para poder llevar a cabo una investigación, es fundamental tener unas bases de conocimientos previos. Gran parte de mi bagaje intelectual proviene de lo aprendido durante muchos años en el departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la UCM. Por ello, quiero agradecer a todos los profesores del departamento el haberme permitido formarme con ellos y el haber estimulado mi deseo por saber y aprender cada día más. Como no, dar las gracias a mis compañeros de poyata (muchísimos durante los años que he pasado en el laboratorio, pero especialmente a la unidad 1, que me adoptó como una “proteómica” más), gracias Lucía M, Carolina H, Raquel M, Virginia C, Rosa H, María I, Laura M, Elena S... por compartir confidencias, por animarme, por los ratitos de risas, en definitiva gracias por los buenos momentos que pasamos juntos.

Pero quiero destacar una inmensa gratitud hacia cuatro personas muy especiales del departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la UCM; Sus conocimientos, su orientación, su forma de trabajar, su persistencia y su motivación, han sido fundamentales para mi formación como investigadora. Primeramente a las Dras. Carmen de la Rosa y Angelines Mosso. Me han enseñado todo lo que sé de microbiología, a apasionarme por esta disciplina, a desenvolverme

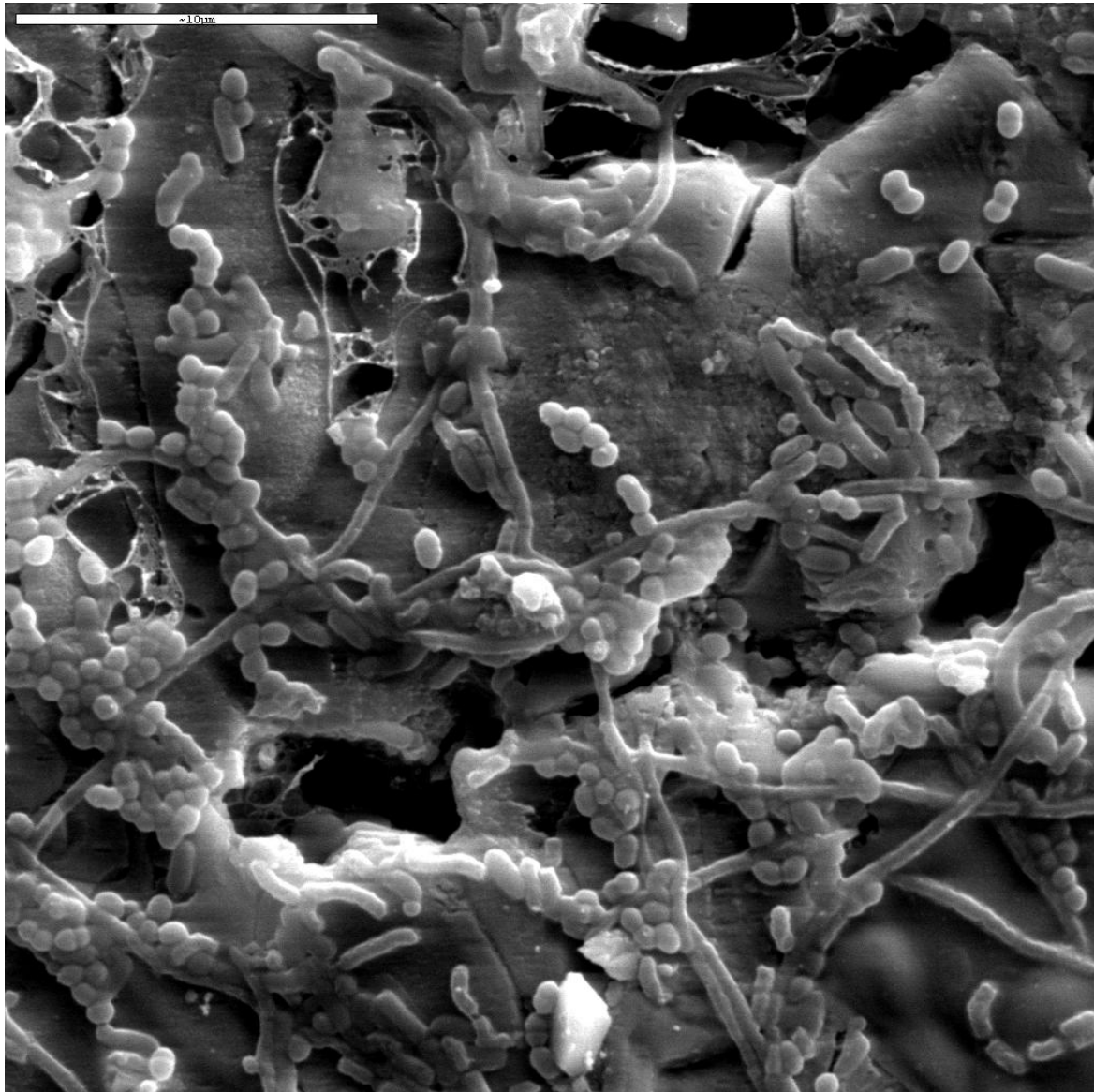
en un laboratorio, a descubrir mi vocación. Gracias por vuestro cariño, por vuestro apoyo en todo momento, por transmitirme tanto. A la Dra. Carmina Rodríguez, amiga, porque con ella me adentré en el mundo de la biología molecular y aprendí a trabajar con meticulosidad. A Conchita Pintado, gracias por tu amistad, cariño y confianza.

Por último, no puedo quedarme sin nombrar a mi familia que ha estado ahí, apoyándome, aguantándome, sufriendo juntos cada uno de mis baches, pero disfrutando de cada uno de mis logros. Son lo mejor que tengo y por ello, mi más cariñoso agradecimiento. Gracias mamá, papá, Javi y Cristina. A mis padres, por estar siempre tan pendientes de mí, de mis necesidades, y de que pueda llegar a todo. Javi, gracias por haber compartido todo de esta tesis, sin ti no hubiera podido hacerlo. Gracias por tu paciencia, por tu apoyo, por tu compañía, por escucharme y por echarme una manita en eso de dar formato al texto. Cristina, porque una sonrisa tuya hace que todo parezca más fácil. También al resto de mi familia por su apoyo e interés durante todo este tiempo, en especial a mis tíos Ana y Fernando, que en esto de la tesis siempre me han motivado para continuar, aún cuando creía que ya no era posible. Gracias a mi segunda familia, tan importante para mí como la primera, porque se han preocupado siempre por mí.

Gracias a todos.



# ÍNDICE

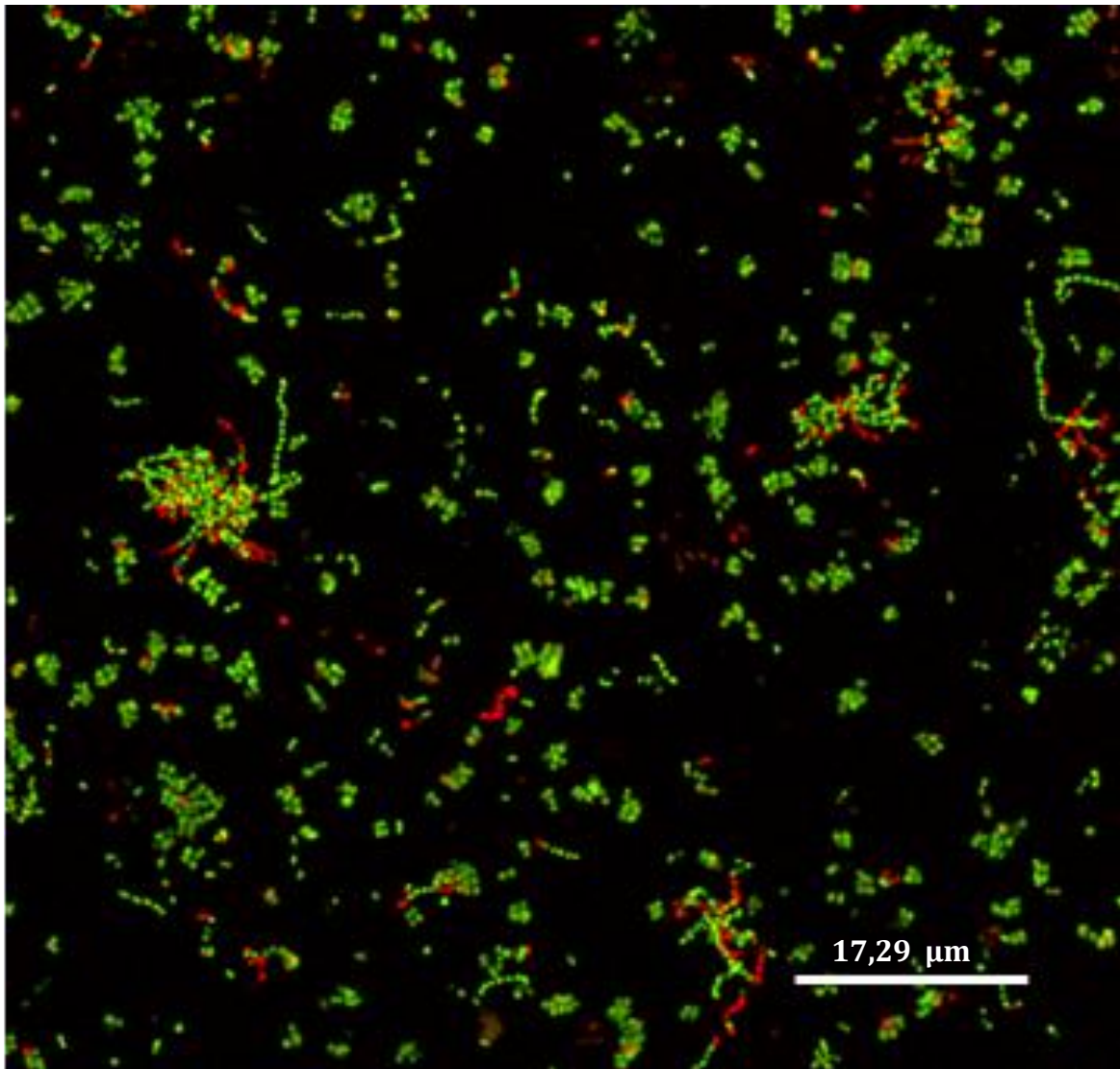




I.	Índice.....	I
II.	Abreviaturas.....	II
III.	Summary.....	III
IV.	Introducción.....	IV
1.	La Biopelícula Bacteriana.....	1
1.1.	El Advenimiento de la “Era Biopelícula”.....	4
1.2.	Arquitectura de la Biopelícula Microbiana.....	5
1.3.	Formación, Desarrollo y Diferenciación de una Biopelícula Microbiana....	10
1.4.	Regulación del Proceso de Formación de la Biopelícula Microbiana.....	17
1.5.	Intercambio Génico.....	19
1.6.	Resistencia Bacteriana.....	20
1.7.	Biopelículas e Infecciones.....	23
2.	La Placa Dental como una Biopelícula Bacteriana.....	25
2.1.	La Cavidad Oral, un Hábitat Microbiano.....	25
2.2.	Arquitectura de la Placa Dental.....	27
2.3.	Desarrollo de la Placa Dental.....	29
2.4.	Composición Bacteriana de la Placa Dental.....	32
2.5.	Interacción entre Microorganismos, Comunicación Célula a Célula y Transferencia de Genes en la Placa Dental.....	35
3.	Placa Dental y Enfermedad.....	38
3.1.	Placa Dental e Infecciones.....	39
3.2.	Repercusiones Sistémicas de las Biopelículas Orales.....	50
4.	Construyendo una Biopelícula. Modelos <i>in vitro</i> de Biopelícula Oral.....	54
V.	Justificación, Hipótesis y Objetivos.....	57
1.	Justificación.....	59
2.	Hipótesis.....	59

3. Objetivos .....	59
VI. Materiales y Métodos. Resultados .....	61
1. ESTUDIO 1 .....	65
2. ESTUDIO 2 .....	77
3. ESTUDIO 3 .....	87
4. ESTUDIO 4 .....	97
VII. DISCUSIÓN .....	109
1. Desarrollo de un Modelo Experimental de Biopelícula Oral <i>in vitro</i> . Estructura de la Biopelícula, Vitalidad Bacteriana y Cinética de Incorporación.....	112
2. Aplicación de Técnicas Metodológicas Basadas en Biología Molecular, e Independientes de Cultivo, para Evaluar la Acción de Agentes Antibacterianos en el Modelo de Biopelícula <i>In Vitro</i> .....	118
2.1. Método de Cuantificación de la Vitalidad Bacteriana Basado en la Bioluminiscencia Procedente de la Molécula Adenosin Trifosfato (ATP). .....	121
2.2. Método de Cuantificación de la Vitalidad Bacteriana Basado en la Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en la Modalidad Cuantitativa a Tiempo Real (qPCR) Combinada con MonoAzida de Propidio (PMA).....	125
VIII. CONCLUSIONES.....	133
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	137

# ABREVIATURAS





**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**ADP:** adenosin difosfato.

**AFSF:** fluoruro de amina/fluoruro de estaño.

**AMP:** adenosin monofosfato.

**AI-2:** autoinductor-2.

**ATP:** adenosin trifosfato.

**ATCC:** colección americana de cultivos tipo.

**bp:** pares de bases.

**CECT:** colección española de cultivos tipo.

**CFU:** unidades formadoras de colonia.

**CHX:** clorhexidina.

**CI:** intervalo de confianza.

**CLSM:** microscopía laser confocal.

**CMB:** concentración bactericida mínima.

**CMI:** concentración mínima inhibitoria.

**CPC:** cloruro de cetilpiridinio.

**Cq:** ciclo de cuantificación.

**Ct:** ciclo umbral.

**DMSZ:** colección alemana de microorganismos y cultivos celulares.

**DS:** desviación estándar.

**EO:** aceites esenciales.

**EPS:** sustancias poliméricas extracelulares.

**EtOH:** etanol.

**HA:** hidroxapatita.

**IPS:** polisacáridos intracelulares.

**LOD:** límite de detección.

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero.

**NCTC:** colección nacional inglesa de cultivos tipo.

**NTC:** control sin muestra o control negativo.

**OD:** densidad óptica.

**PBS:** buffer fosfato salino.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**Pi:** ortofosfato.

**PMA:** monoazida de propidio.

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa en modalidad cuantitativa.

**RLU:** unidades relativas de luz.

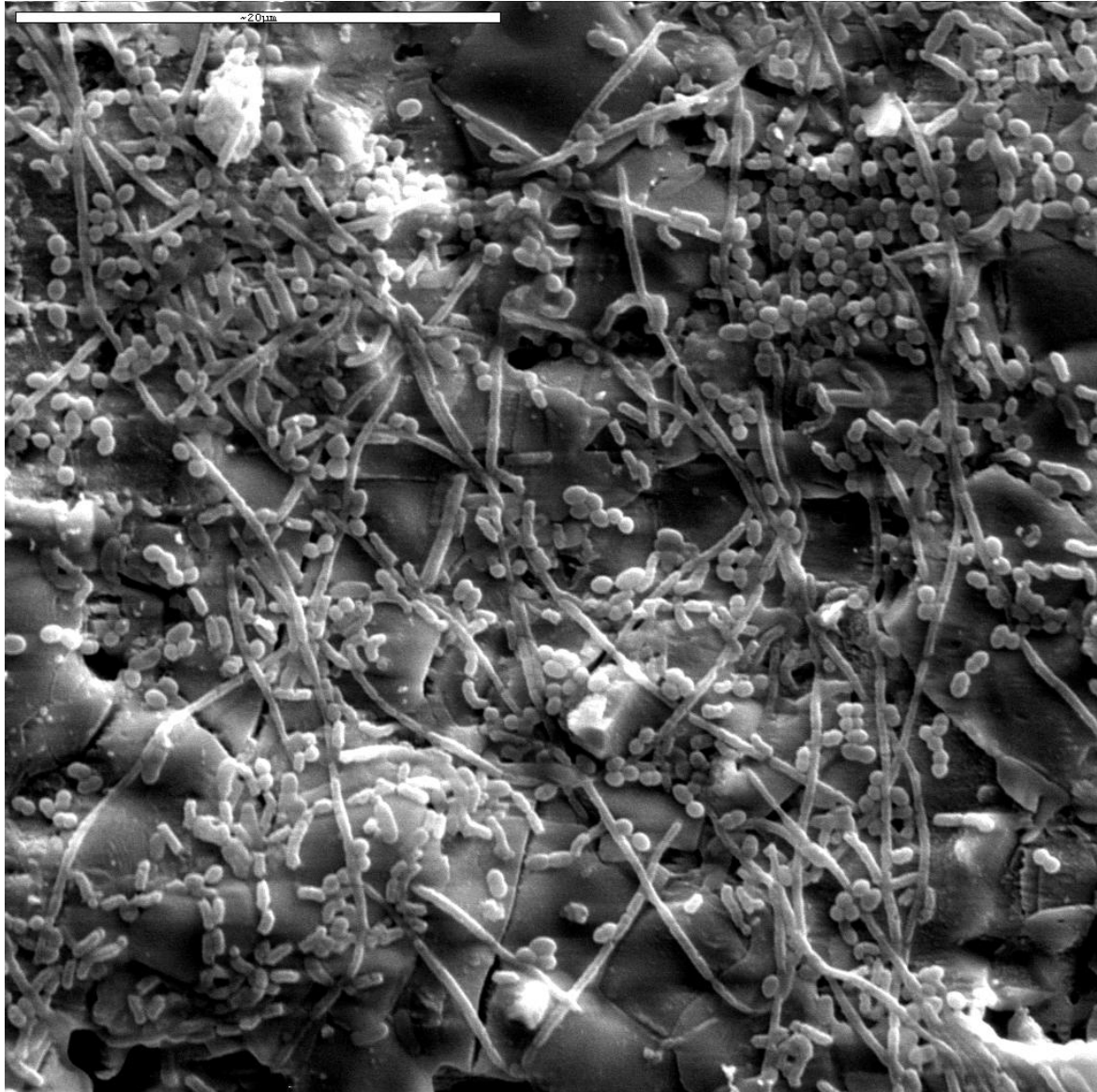
**SD:** desviación estándar.

**SDS:** dodecil sulfato sódico.

**T-RF:** fragmento terminal de restricción.

**T-RFLP:** polimorfismo en la longitud del fragmento terminal de restricción.

# SUMMARY





## Background and Objectives

The human oral cavity is a complex ecological environment where microorganisms, bathed in a liquid medium (saliva), have access to both hard and soft tissue and artificial surfaces to develop biofilms. Bacteria adhered to tooth surfaces as a biofilm are denominated dental plaque. The development and maturation of dental plaque as a biofilm has profound implications in the aetiology and progression of the most prevalent infections affecting humans, namely, dental caries and periodontal diseases.

The composition of dental plaque has been studied using different bacterial identification methods, identifying hundred of microorganisms. However, there is a lack of adequate knowledge of its structure, community dynamics and ecological determinants. This is probably due to the inherent heterogeneity and structural complexity of these biofilms and to the difficulties of studying *in vivo* dental plaque in health and disease. Moreover, owing to the well described implications of these biofilms in the aetiology of different oral diseases, it is important to optimize methodologies to assess and quantify these microbial communities, as well as to study the impact of different preventive and therapeutic antiplaque strategies, both mechanical and pharmacological, on these bacterial communities.

The purpose of this study was, first, to develop and validate an *in vitro* biofilm model, aiming to simulate the composition of the subgingival microbiota, comprising initial (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*), early (*Veillonella parvula*), secondary (*Fusobacterium nucleatum*) and late colonizers (*Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Also, we attempted to study its structure and dynamics using both morphological (confocal laser scanning microscopy; CLSM) and molecular approaches (terminal restriction fragment length polymorphism; T-RFLP). In second place, the experimental subgingival biofilm model was used to evaluate the efficacy of two techniques for rapid quantitative evaluation of viable oral bacteria in biofilms samples, in order to test the bactericidal efficacy of antiseptic agents: ATP bioluminescence method and the quantitative real-time PCR (qPCR) in conjunction with propidium monoazide (PMA).

## Results, Discussion and Conclusions

In this investigation, an *in vitro* biofilm model has been developed and validated, using defined multibacterial species from the subgingival plaque. The combined use of CLSM and T-RFLP of genes encoding 16S *rRNA* demonstrated the usefulness of these techniques for studying the spatial distribution and dynamics of specific members of the bacterial communities in a biofilm model. The experimental model, reproducible and technically simple to prepare, maintain and analyse, demonstrated to be very suitable for studying the development, structure and dynamics of the subgingival biofilm, as well as for undertaking comparative studies to test different antimicrobial approaches. For this purpose, the use of the ATP bioluminescence method for rapid quantitative evaluation of viable total oral bacteria in biofilm samples after exposure to the antimicrobial agents was validated. The obtained results have shown that the ATP bioluminescence method was capable of quantifying bacterial vitality, when applied to a validated *in vitro* biofilm model. In fact the relative antimicrobial effect of three tested antimicrobial compounds was demonstrated with this method when compared with a negative control, and these results were similar when compared to standard culturing techniques. Also, the efficacy and applicability of the PMA-based live–dead method, when combined with qPCR, was demonstrated, for assessing the bacterial viability within the biofilm and thus discriminating the DNA counts from viable versus dead cells once the biofilm has been exposed to an antimicrobial agent. This method was targeted, not only to evaluate the antibacterial impact on the total amount of bacteria, but also to specific bacterial pathogens, such as to bacteria strongly associated with periodontitis (*P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*), or to moderately associated pathogens such as *F. nucleatum*, which may play an important role in biofilm development, by building the scaffold between the early colonizers and the true oral pathogens.

## **Prefacio**

La presente tesis doctoral se basa en las siguientes investigaciones originales publicadas en revistas científicas:

**Artículo original 1.** Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research* 2011; 46:252-260.

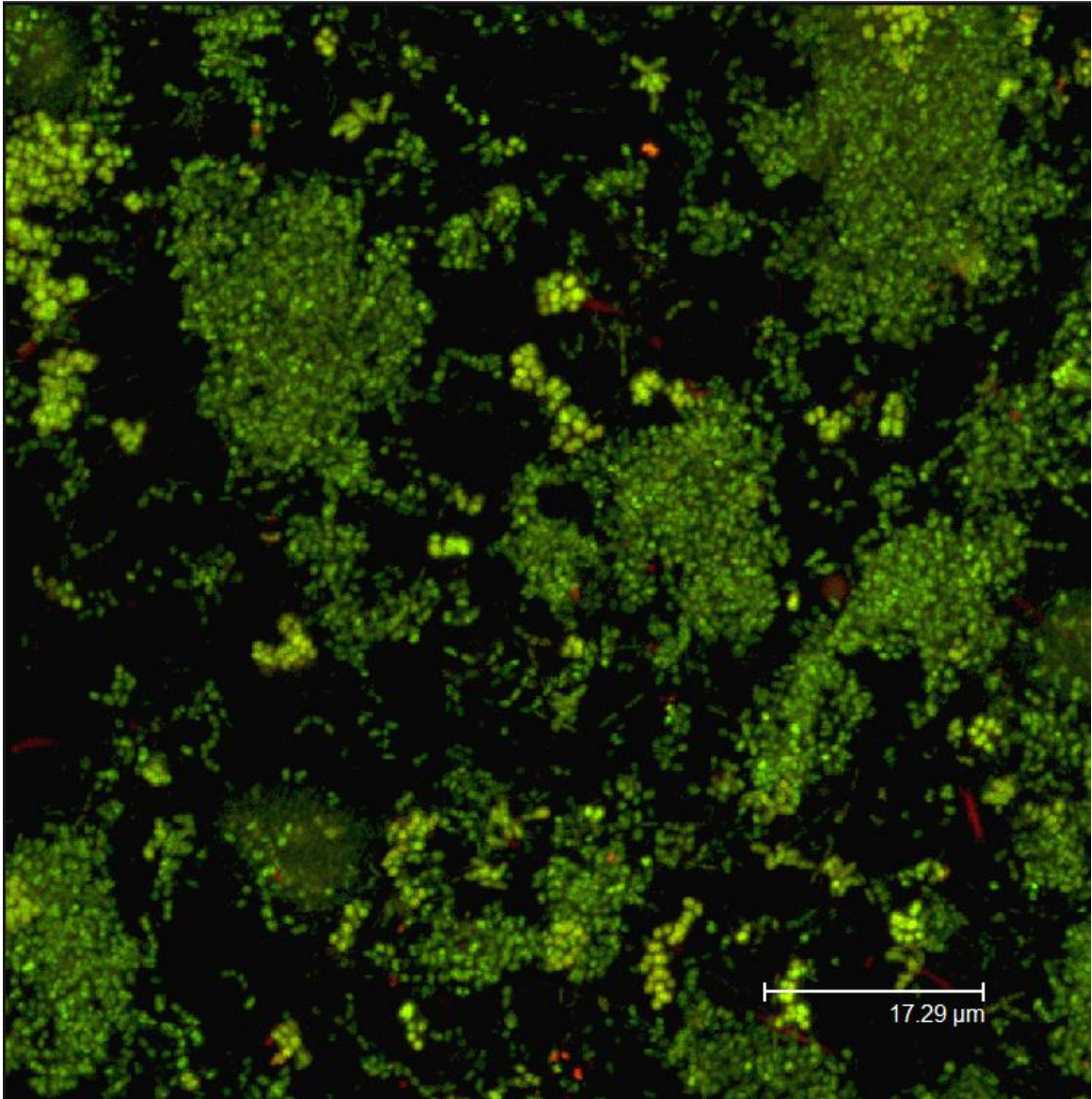
**Artículo original 2.** Sánchez MC, Llama-Palacios A, Marín MJ, Figuero E, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an *in vitro* subgingival-biofilm model. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2013;18:e86-92.

**Artículo original 3.** Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, Herrera D, Sanz M. Analysis of viable vs dead *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* using selective quantitative real-time PCR with propidium monoazide. *Journal of Periodontal Research* 2013; 48: 213–220.

**Artículo original 4.** Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an *in vitro* subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research* 2013; doi: 10.1111/jre.12073.



# INTRODUCCIÓN





## 1. LA BIOPELÍCULA BACTERIANA

Las bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiendo presentar dos fenotipos de crecimiento: células individuales de libre flotación (planctónicas) o células agregadas en colonias de microorganismos sésiles. Este último se conoce comúnmente como el modo de crecimiento en biopelícula o “biofilm” (Donlan, 2002; Lasa y col., 2005). La capacidad de formar biopelícula no parece restringirse a ningún grupo específico de bacterias y, en la actualidad, se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de estas, independiente de la especie, puede habitar en biopelículas; se estima que aproximadamente el 99% de las células bacterianas están en la naturaleza en forma de biopelícula, y tan sólo el 1% viven en estado planctónico (Costerton y col., 1995; Donlan y Costerton, 2002).

Son numerosas las definiciones propuestas de una biopelícula bacteriana, coincidiendo en ser descrita como una comunidad de microorganismos incluidos en una matriz producida por ellos, para unirse entre sí y a sustratos vivos o inertes. Donlan y Costerton (2002) puntualizan que se trata de «una comunidad bacteriana sésil inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un sustrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes». En efecto, numerosos estudios han demostrado que las bacterias en la biopelícula poseen una expresión génica diferente respecto a sus homólogas planctónicas, originando bacterias fenotípicamente distintas respecto a aquéllas. Por ejemplo, la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a una superficie conlleva la regulación positiva de genes involucrados en la síntesis de alginato en los 15 minutos del contacto inicial, o en el caso de *Porphyromonas gingivalis*, que cuando crece en biopelícula aproximadamente el 18% de su genoma se expresa diferencialmente, con regulación negativa de genes involucrados en el crecimiento y en la biosíntesis

de cofactores, y regulación positiva de genes involucrados en la síntesis de proteínas de transporte y de mecanismos de unión (Marsh y col., 2011).

Las biopelículas microbianas son ubicuas. Podemos encontrar biopelículas en cualquier medio donde existan microorganismos, ya que pueden desarrollarse sobre todo tipo de superficies (hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas) o bien unidas unas a otras; solo se requiere la presencia de un entorno hidratado y una mínima cantidad de nutrientes. Se observan biopelículas recubriendo las piedras de los lechos de los arroyos, ríos y con frecuencia en la superficie de aguas estancadas, en los ambientes más extremos, como por ejemplo, en geiseres con temperaturas muy elevadas, en aguas de manantiales termales de un amplio rango de pH, desde muy ácido a muy alcalino, o en glaciares. Cotidianamente convivimos con ellas en las duchas, en las tablas de cortar alimentos, incluso en las cerdas de un cepillo de dientes (Lasa, 2005; Zamora, 2009). Su presencia ejerce un enorme impacto en diversos aspectos de nuestra vida, como son el tratamiento de aguas residuales, la transformación de productos fermentados, la corrosión de materiales, la contaminación de alimentos durante su procesamiento en la industria alimentaria, el colapso de tuberías, las interacciones planta-microorganismo en la rizosfera, la formación de la placa dental, el desarrollo de infecciones crónicas sobre tejido vivo o asociadas a implantes médicos, entre otros (Figura 1) (Costerton y col., 1999; Zamora, 2009).



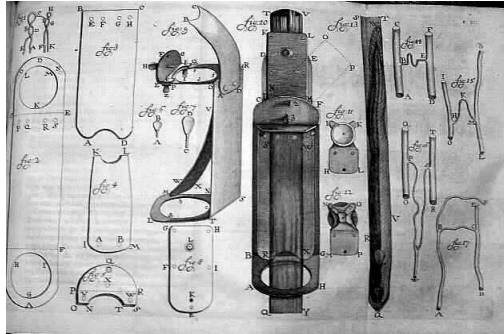
**Figura 1.** Biopelículas microbianas en diferentes hábitats: en el lecho de un río (masa verdosa), en el interior de una tubería (masa anaranjada), y sobre dientes (masa blanquecina-amarillenta).

Pero, ¿por qué son tan importantes? Aunque están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en muchos casos tienen efectos beneficiosos, las biopelículas son un problema de salud pública. Son las responsables de infecciones tales como periodontitis, otitis media, endocarditis, fibrosis quística, y de la mayoría de las infecciones nosocomiales (infecciones de catéteres, implantes médicos, prótesis, etc.). Investigaciones recientes estiman que, de las infecciones microbianas que afectan al cuerpo humano, entre el 66-80% están causadas por bacterias organizadas en biopelículas (Lewis, 2001). Es evidente que la formación de biopelículas es una estrategia adaptativa de los microorganismos; en el interior de la biopelícula, las bacterias son más resistentes a los antibióticos y al sistema inmune, lo cual explica el carácter crónico y la dificultad del tratamiento de estas infecciones (Marsh y col., 2011; Lasa y col., 2005). El crecimiento en biopelícula ofrece cuatro ventajas importantes:

- proporciona protección a los microorganismos frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y/o pH, a la acción de los agentes adversos como son los mecanismos de defensa del hospedador, a sustancias potencialmente tóxicas como productos químicos o antibióticos letales o protección frente a microorganismos competidores;
- incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento y facilita la eliminación de desechos;
- facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación;
- posibilita la transferencia de material genético: ácido desoxirribonucleico (ADN).

### 1.1. EL ADVENIMIENTO DE LA “ERA BIOPELÍCULA”

Desde 1880 hasta mediados del siglo XX, la microbiología convencional se encontraba en el popularmente denominado “período del cultivo puro” (Atlas y Bartha, 1997). Durante este período, las bacterias se estudiaban como células individuales de flotación libre. La primera observación de bacterias como agregados asociados a una superficie fue hecha por Antonie van Leeuwenhoek en 1684, que, utilizando sus simples microscopios de luz (Figura 2), describió la presencia de microorganismos adheridos a superficies dentales (Donlan y Costerton, 2002). Sin embargo, el interés por las mismas no surge hasta comienzos del siglo XX, cuando comenzamos a conocer que, en la mayoría de los ambientes naturales y patogénicos, la forma preferente de crecimiento bacteriano es constituyendo comunidades altamente estructuradas (Costerton y col., 1978 y 1999).



**Figura 2.** Dibujo de los microscopios de Antonie van Leeuwenhoek realizado por Henry Baker.

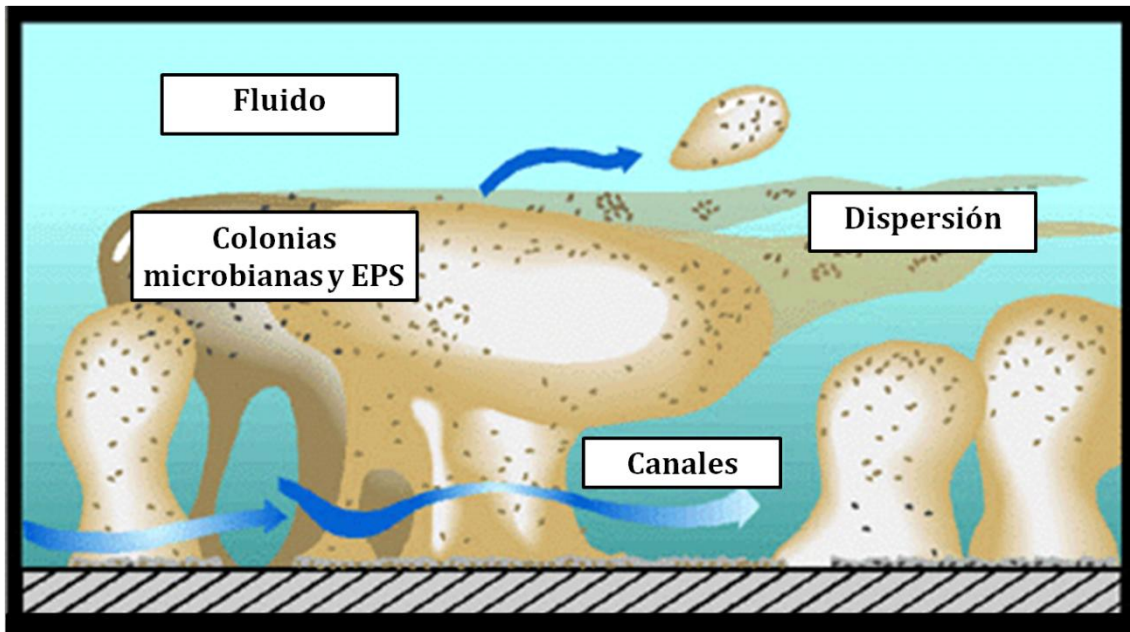
En ese momento, destacan los trabajos con las bacterias organizadas en biopelículas de Heukelekian y Heller (1940), que trabajaron con microorganismos marinos y observaron que, tanto la tasa de crecimiento, como la actividad bacteriana se veían substancialmente mejoradas por la incorporación de una superficie sobre la cual estos microorganismos pudieran unirse; o las investigaciones de Zobell (1943), que revelaron como el número de bacterias en superficies era mucho mayor que las que permanecían suspendidas en el agua marina que las rodeaba. Sobresalen también los trabajos de Winogradsky y

colaboradores, que observaron las diferencias en el crecimiento de bacterias obtenidas a partir de suelo, cultivadas en una fase acuosa frente a las adheridas a un portaobjetos, y de Characklis (1973), que procedió a estudiar limos microbianos en sistemas de aguas industriales, logrando demostrar su tenacidad y resistencia a diferentes desinfectantes, entre ellos, al cloro. Posteriormente, Costerton y colaboradores (Costerton y col., 1978), tratando de encontrar una explicación de la resistencia bacteriana a desinfectantes en sistemas de aguas industriales, describieron la presencia de comunidades bacterianas embebidas en una matriz glucoproteica desarrolladas en superficies en contacto con el agua, a las que denominaron biopelículas. Como hipótesis, achacaron la resistencia investigada a esa forma de organización. Por tanto, no fue hasta 1978, cuando se utilizó el término de biopelícula por primera vez para describir este fenómeno.

En 1993, la Sociedad Americana de Microbiología reconoció que el fenotipo de crecimiento microbiano en biopelículas era pertinente a la microbiología (Costerton, 1994). Como resultado, el crecimiento bacteriano en biopelícula será aceptado cada vez más como un importante rasgo bacteriano, y en la actualidad es un importante objetivo de investigación en el campo de la microbiología. El avance de las técnicas de biología molecular y de microscopía está permitiendo un examen más detallado de estas comunidades tan complejas. Dos grandes avances han incrementado substancialmente la comprensión de las mismas: (1) la utilización del microscopio láser confocal y electrónico de barrido, que ha permitido caracterizar la ultraestructura de la biopelícula, y (2) la investigación de los genes involucrados en la adhesión celular y la formación de la biopelícula (Tolker-Nielsen y Molin, 2000; Donlan, 2002).

### **1.2. ARQUITECTURA DE LA BIOPELÍCULA MICROBIANA**

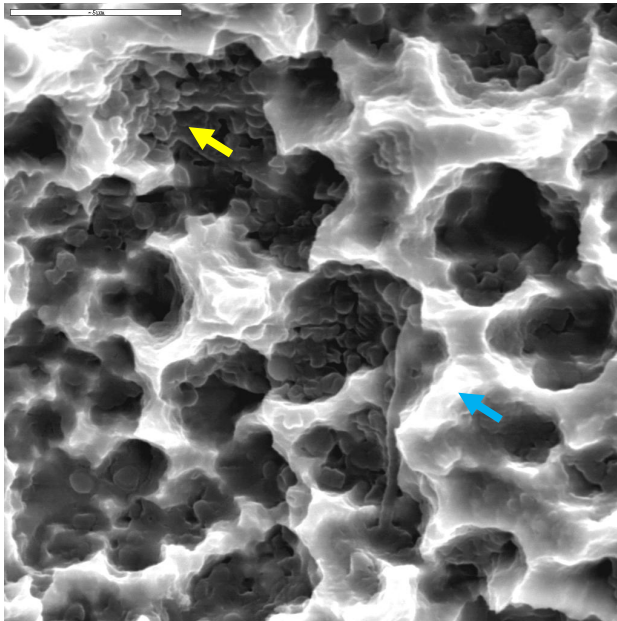
Toda comunidad microbiana desarrollada en biopelícula es única en su género, aunque algunos atributos estructurales pueden ser considerados universales (Figura 3) (Tolker-Nielsen y Molin, 2000).



**Figura 3.** Representación de la arquitectura de una biopelícula microbiana (EPS: sustancias poliméricas extracelulares, por sus siglas en inglés); figura adaptada del “Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman”.

La arquitectura de las biopelículas es muy heterogénea y en ella podemos distinguir tres elementos clave: grandes colonias de microorganismos sésiles incrustadas o rodeadas por una matriz polimérica extracelular o glicocálix, y separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos (Donlan, 2002).

Los microorganismos que componen una biopelícula representan el 15-20% del total del volumen y se organizan en torreones celulares, que se extienden en forma tridimensional desde la superficie a la cual están adheridas. Estos torreones están compuestos por microcolonias de diferentes células microbianas, tanto aeróbicas como anaeróbicas, englobadas por una matriz polimérica extracelular (Figura 4) (De Beer y col., 1994; Donlan, 2002).

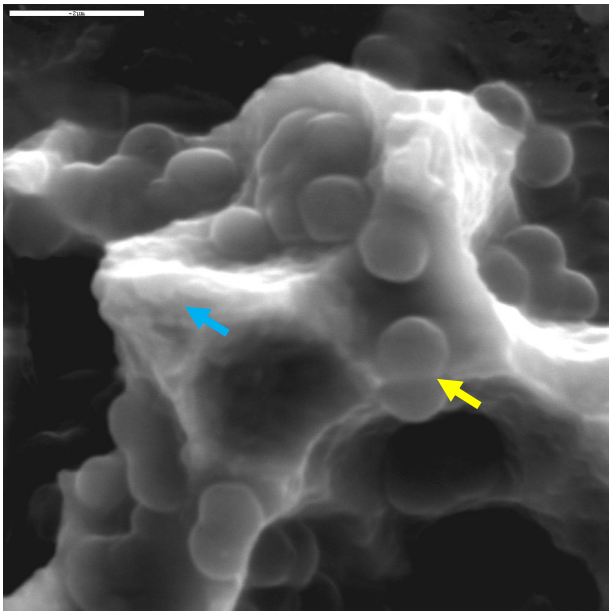


**Figura 4.** Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas de una biopelícula bacteriana madura, desarrollada en un sistema *in vitro* de biopelícula oral, sobre titanio. Se puede apreciar la estructura típica de una biopelícula, con los torreones de bacterias (flecha amarilla) compactadas por la matriz polimérica extracelular (flecha azul) y separadas por espacios intersticiales huecos (barra escala = 5  $\mu\text{m}$ ).

La matriz representa aproximadamente el 85% del total de la biopelícula (Figuras 4 y 5). Está formada fundamentalmente por agua, llegando este elemento a representar hasta el 97% de la matriz, y por sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés), producidas por los propios microorganismos integrantes y que aportarán entre el 50 y 90% del carbono orgánico total de la biopelícula (Costerton y col., 1995; Sutherland, 2001; Donlan, 2002; Branda y col., 2005; Lasa y col., 2005).

La composición en EPS de la matriz de una biopelícula no está perfectamente definida, y es que difiere de una biopelícula a otra debido a que cada microorganismo producirá uno de diferente composición; esto no es de extrañar, ya que los microorganismos poseen vías metabólicas distintas que les permite sintetizar una gran variedad de sustancias poliméricas. En el caso de las bacterias, los EPS procedentes de las Gram-negativas son, por lo general, polisacáridos neutros o polianiónicos, mientras que los procedentes de las bacterias Gram-positivas son de carácter catiónico. Así, por ejemplo, *P. aeruginosa* produce un exopolisacárido rico en alginato, en celulosa en el caso de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio*

*cholerae*, rico en poli-Nacetilglucosamina en *Staphylococcus aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que, incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir, además de alginato, un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio-aire al que se ha denominado “Pellican” (Sutherland, 2001; Branda y col., 2005; Lasa y col., 2005).



**Figura 5.** Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas de una biopelícula bacteriana de 12 horas de evolución, desarrollada en un sistema *in vitro* de biopelícula, sobre titanio. Se pueden apreciar las bacterias (flecha amarilla) compactadas por la matriz polimérica extracelular, que se aprecia como una masa densa brillante (flecha azul) (barra escala = 2  $\mu\text{m}$ ).

Los EPS desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de la biopelícula, en la prevención de la desecación y frente al ataque de agentes perjudiciales, y es que:

- actúan como material de sostén de la estructura. La presencia de ácidos urónicos como el D-glucurónico, D-galacturónico, el ácido manurónico o los piruvatos confieren a la matriz un carácter aniónico, que permite la fijación de cationes divalentes como el calcio y el magnesio. Estos cationes

establecen enlaces entre las cadenas de polímeros que proporcionan potentes fuerzas de unión en la biopelícula (Donlan, 2002);

- pueden fijar nutrientes esenciales, como cationes, para crear un medio nutritivo rico que favorezca a microorganismos específicos. Además, pueden actuar como amortiguadores y ayudan a la retención de enzimas extracelulares y sus sustratos, que favorecen la utilización de los mismos por parte de las células microbianas (Sutherlan, 2001; Donlan, 2002);
- los EPS están altamente hidratados por la incorporación de grandes cantidades de agua en su estructura mediante enlaces de hidrógeno, evitando la desecación de la biopelícula (Donlan, 2002);
- los EPS pueden estar asociados con iones metálicos y cationes divalentes. Pueden tener carga neutra o carga polianiónica, según el tipo de exopolisacárido, lo que les permitiría interactuar con distintos agentes antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias (Donlan, 2000).

En menor cantidad, en la matriz se encuentran otras macromoléculas como proteínas, sales, ácidos nucleicos y diversos productos que proceden de la lisis microbiana (Lasa y col., 2005). Estudios recientes postulan que la matriz de biopelículas de *P. aeruginosa* contienen ADN como constituyente principal (Donlan, 2002). En la matriz también pueden hallarse materiales no microbianos, tales como cristales de sales minerales, partículas de corrosión y/o de sedimento, o componentes sanguíneos, según sea el medioambiente en el cual se desarrolla la biopelícula.

El tercer elemento característico en la arquitectura de una biopelícula lo componen los espacios intersticiales huecos (Figura 4). Se trata de canales de agua, que permiten el flujo de líquido y actúan como un sistema circulatorio primitivo para el transporte y difusión de nutrientes y oxígeno a los microorganismos

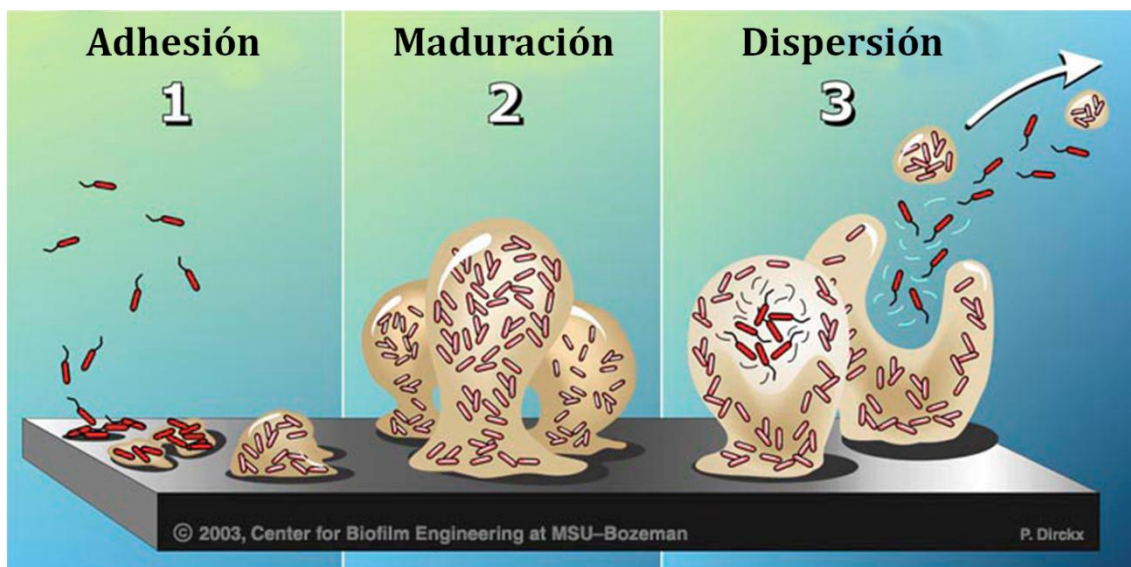
ubicados en su interior, incluso aquéllos situados en las zonas más profundas de la biopelícula. Asimismo, estos canales constituyen un mecanismo para la eliminación de productos de desecho metabólico. La existencia de estos canales dentro de la biopelícula provocará que se generen ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno será diferente; se generan gradientes de tensión de pH y de oxígeno, siendo metabólicamente más activas las áreas superficiales respecto a las más profundas. En estas últimas, los microorganismos deberán adaptarse a una disponibilidad reducida de oxígeno (De Beer y col., 1994; Donlan, 2002; Sanderson y col., 2006).

Del mismo modo, la arquitectura de la biopelícula microbiana no es solo heterogénea en su distribución espacial, sino también en el tiempo, constantemente cambiante debido a procesos internos y externos. La arquitectura de las microcolonias evoluciona desde una estructura compacta a una pérdida de la misma en el tiempo, pasando las células de dichas microcolonias a un estado móvil que les permitirá dispersarse desde la biopelícula y colonizar otras superficies cercanas (Tolker-Nielsen y Molin, 2000).

### **1.3. FORMACIÓN, DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA MICROBIANA**

La formación de una biopelícula es un proceso dinámico y complejo. El mecanismo de formación depende de numerosos factores tanto intrínsecos al microorganismo como propios del medio que lo rodea, incluida las características del substrato al cual se une. Así, por ejemplo, las biopelículas generadas en una superficie biótica como una mucosa animal son fisiológicamente diferentes de aquellas formadas en superficies inertes y es que las primeras son moduladas por la respuesta inflamatoria, por proteínas y por células del hospedador, que contribuyen al proceso de desarrollo y composición (Post y col., 2004). Sin embargo, al igual que ocurre con su arquitectura, la formación de las mismas podría considerarse como un evento caracterizado por tres fases comunes a todo proceso de diferenciación y desarrollo, con resultados similares en el progreso de

ellas, independientemente de las especies que participen y el ambiente donde se desarrolle: fase (1) de adhesión reversible de los microorganismos a la superficie seguida de unión irreversible y fase inicial de maduración de la biopelícula con crecimiento y división de los microorganismos, (2) una etapa de producción de exopolímero y maduración, y (3) fase de desarrollo final de las colonias y dispersión de células colonizadoras (figura 6) (Davey y O'Toole, 2000).



**Figura 6.** Representación de la dinámica de formación de una biopelícula microbiana, figura adaptada del "Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman".

A continuación se detallan los procesos incluidos dentro de cada fase del desarrollo de una biopelícula:

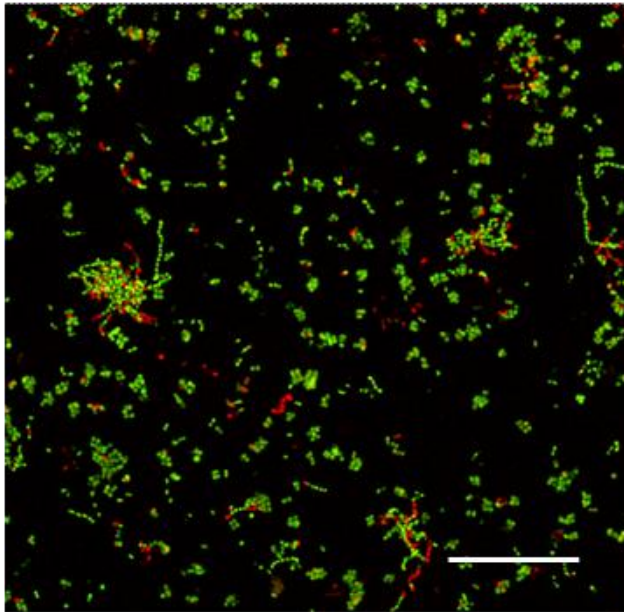
### **Fase 1. Adhesión reversible y posteriormente irreversible a una superficie**

La etapa inicial del proceso de formación de una biopelícula es la adhesión de una célula sobre una superficie, o bien entre ellas mismas. Este fenómeno puede verse afectado por una serie de factores: por un lado, factores biológicos inherentes a los microorganismos que van a participar (motilidad, tasa de crecimiento, producción de EPS, etc.); por otra parte, por factores físicos y

químicos de la superficie, como su rugosidad y composición química; y finalmente, por factores del medio líquido en el que se desarrolla, como la velocidad del flujo o la composición química del mismo (Stoodley y col., 2002).

La adhesión de los microorganismos a las superficies sólidas se produce en dos etapas: un estado reversible en el que los mismos se adhieren débilmente, y posteriormente un estado de unión irreversible, durante el cual la adherencia se consolida (Figura 7).

La fase reversible consiste en una unión débil de los microorganismos con el sustrato mediante fuerzas de van der Waals, electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Este proceso va a depender de factores ambientales, como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que afectan a aspectos como la motilidad, la sensibilidad ambiental y la presencia de determinadas proteínas en la superficie de la célula en cuestión (Stoodley y col., 2002). En bacterias Gram-negativas (por ejemplo: *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *Escherichia coli* o *S. enterica*) se ha visto que la presencia de flagelos, fimbrias de tipo I y IV y curli, son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad parece también que ayuda a los microorganismos a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram-positivas no motiles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biopelículas. En el caso de las bacterias Gram-positivas, se ha descrito la participación de proteínas de superficie (por ejemplo: AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia (Lasa y col., 2005).



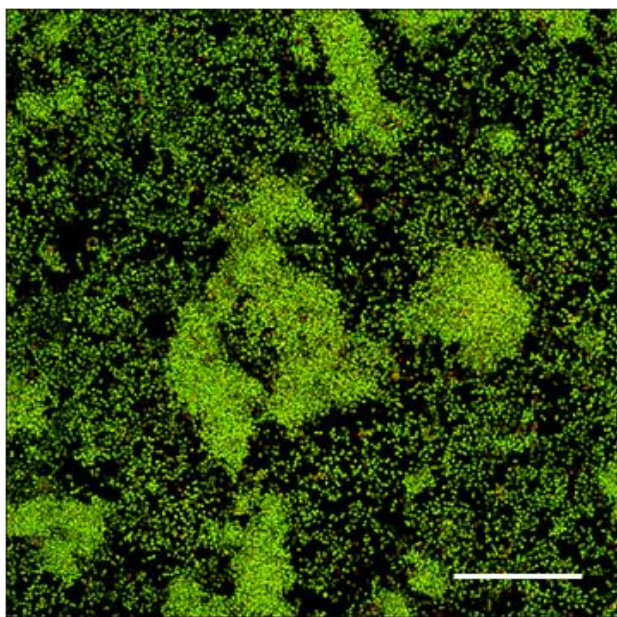
**Figura 7.** Micrografía obtenida por microscopía laser confocal y teñida con el colorante vital LIVE/DEAD® BacLight™ de una biopelícula bacteriana de 12 horas de evolución, desarrollada en un sistema *in vitro* de biopelícula, sobre el material de hidroxiapatita. Se puede apreciar las bacterias colonizando la superficie del material como células individuales o pequeños agregados (barra escala = 17,29  $\mu\text{m}$ ).

La fase irreversible es dependiente del tiempo y resulta del anclaje a la superficie de los apéndices microbianos, en caso de que existan y/o de la producción por parte de las células microbianas inicialmente adheridas de compuestos poliméricos extracelulares. En esta fase los microorganismos sintetizan la matriz de exopolisacáridos para establecer un contacto físico entre ellos y la superficie. El tiempo de contacto necesario es mínimo; este periodo es usualmente corto y varía en función de la disponibilidad de nutrientes, temperatura o presencia de antibióticos (Stoodley y col., 2002; Chmielewsky y Frank, 2003; Lasa y col., 2005).

Durante las fases de adhesión, los microorganismos cambian su fenotipo y llegan a ser básicamente diferentes respecto a su forma planctónica. Este cambio implica la expresión de genes específicos, se producen cambios y alteraciones en su morfología y cambia su tasa de crecimiento (Donlan y Costerton, 2002).

### Fase 2. Crecimiento y maduración

Una vez se han establecido, las células microbianas se multiplican dando lugar a microcolonias y posteriormente a la biopelícula madura (Figura 8).



**Figura 8.** Micrografía obtenida por microscopía laser confocal y teñida con el colorante vital LIVE/DEAD® BacLight™ de una biopelícula bacteriana de 72 horas de evolución, desarrollada en un sistema *in vitro* de biopelícula, sobre el material de hidroxiapatita. Se puede apreciar una población densa de bacterias, colonizando la superficie del material como microcolonias (barra escala = 17,29  $\mu\text{m}$ ).

El microorganismo que se ha adherido a la superficie comienza a dividirse y las células microbianas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como sucede durante el proceso de formación de colonias en las placas de medios con agar (Lasa y col., 2005). Sin embargo, dado que también pueden proliferar otros tipos de microorganismos en una región adyacente, la película comienza a adquirir una mezcla de distintos microorganismos, creciendo en complejidad. Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente de la biopelícula, se desarrollará una estructura organizada; a este proceso se le denomina maduración. Una biopelícula madura puede consistir en una simple capa de microorganismos o en múltiples capas de microcolonias embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares. Esta fase de crecimiento y maduración depende de factores como la disponibilidad de

nutrientes, la diversidad microbiana de la comunidad, la disponibilidad de agua y el transporte celular (Chmielewsky y Frank, 2003).

A medida que madura la biopelícula, se va adaptando a la presencia de nutrientes, al oxígeno y a los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas. Los microorganismos con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de las capas de la matriz, cerca de los canales de agua. El número de microorganismos viables se reduce con la edad de la biopelícula; así en una biopelícula bacteriana joven se han detectado cerca de un 80% de células viables, y tan solo un 50% en una biopelícula madura (Branda y col., 2005).

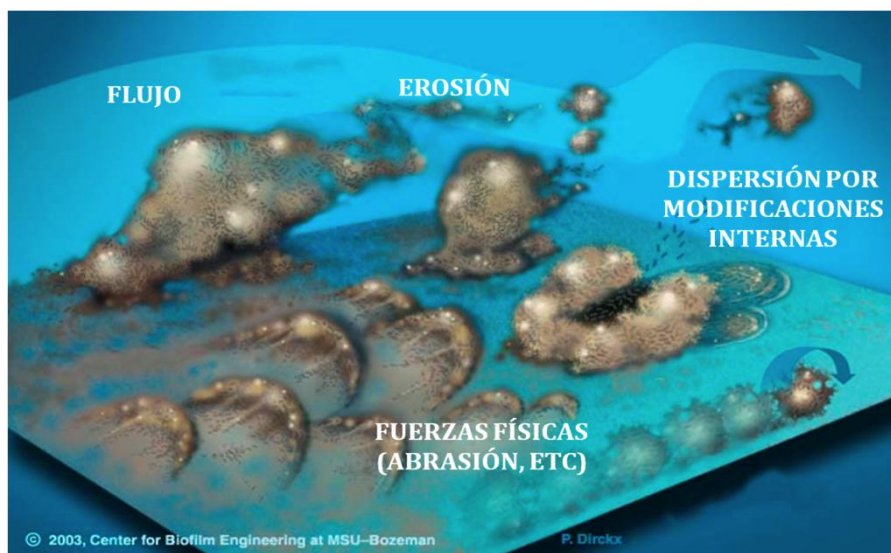
### **Fase 3. Dispersión de células colonizadoras**

Finalmente, algunos microorganismos de la matriz de la biopelícula se liberan de la misma para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso. La liberación de los microorganismos desde la biopelícula es la parte del proceso que menos se conoce (Figura 9).

La dispersión se puede deber a:

- modificaciones internas en la estructura de la biopelícula, que conlleva la dispersión de células microbianas (Donlan, 2002; Lasa y col., 2005);
- la actuación de fuerzas físicas. Los tres principales procesos que permiten la liberación celular son la erosión (eliminación continua de pequeñas porciones de la biopelícula), la muda (liberación rápida y masiva) y la abrasión (desprendimiento debido a la colisión de partículas de líquido contra la biopelícula) (Donlan, 2002);

- las capacidades innatas de las propias bacterias integrantes de la biopelícula; por ejemplo, para la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se ha descrito una actividad enzimática que degrada de forma específica el exopolisacárido de la matriz de la biopelícula. La presencia en distintos proteomas de hipotéticas proteínas (endoglucanasas) que podrían ser responsables de una función similar, sugiere que la degradación controlada del exopolisacárido puede representar un mecanismo controlado de liberación de bacterias de la biopelícula (Lasa y col., 2005).



**Figura 9.** Diferentes fenómenos observados en las biopelículas microbianas y que están implicados en la dispersión de las células microbianas de la misma. Figura adaptada del “Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman”.

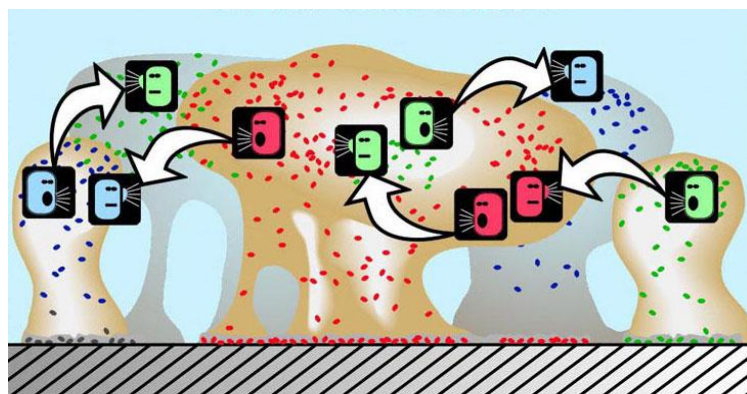
La liberación de bacterias desde la biopelícula, por ejemplo, también se ha demostrado que es un proceso especie-específico; *Pseudomonas fluorescens* se dispersa y recoloniza una superficie después de aproximadamente 5 h, *Vibrio parahaemolyticus* después de 4 h y *Vibrio harveyi* después de sólo 2 h. Este proceso probablemente proporciona un mecanismo de migración bacteriana desde áreas

fuertemente colonizadas que han agotado los nutrientes a áreas más favorables para el crecimiento (Donlan, 2002).

El modo de dispersión influye, aparentemente, en las características fenotípicas de los microorganismos. Los agregados erosionados desde la biopelícula por fuerzas físicas mantienen ciertas características del fenotipo biopelícula, como las propiedades de resistencia antimicrobiana, mientras que las bacterias que han sido dispersadas como resultado del crecimiento normal de la biopelícula pueden revertir rápidamente al fenotipo planctónico (Donlan, 2002).

#### 1.4. REGULACIÓN DEL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA MICROBIANA

La comunicación entre los microorganismos es esencial para diferenciarse con éxito en biopelícula. En la unión de los microorganismos a una superficie y ulterior formación de una biopelícula, se requiere de señales químicas coordinadas que les permitan comunicarse entre ellos. Este proceso se denomina “quorum-sensing” y beneficia a la bacteria al permitirle detectar la presencia de microorganismos próximos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes (Figura 10) (Kolenbänder y col., 2002; Lasa y col., 2005).



**Figura 10.** Representación del fenómeno “quorum-sensing” dentro de una biopelícula microbiana. Figura adaptada del “Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman”.

El sistema de “quorum-sensing” es un mecanismo de regulación de la expresión génica dependiente de la acumulación en el medioambiente de una molécula señal denominada autoinductor. Cada microorganismo que se une a una superficie produce una molécula, de manera tal que cuantos más microorganismos se unen, mayor es el incremento de la concentración local de esta señal. La detección de un umbral mínimo de concentración de estas moléculas induce a los microorganismos a una modificación en su expresión génica. Recientes avances en este campo indican que la comunicación célula-célula vía autoinductores ocurre tanto entre células de la misma especie como entre especies diferentes (Miller y Bassier, 2001). Igualmente, ha quedado demostrado que la detección de “quorum-sensing” puede influir también en la composición microbiana de la comunidad al alentar la proliferación de especies beneficiosas para la biopelícula y desalentar la proliferación de competidores (Davies y col., 1998; Potera, 1999; Singh y col., 2000; Donlan, 2002; Post y col., 2004). Xie y colaboradores (2000) describen como ciertas bacterias presentes en la placa dental pueden influir en la incorporación de determinadas especies patógenas como *P. gingivalis*. La colonización de *P. gingivalis* está mediada, entre otros factores, por la adhesión mediante fimbrias. El gen *fimA* codifica la subunidad proteica mayor de la fimbria y puede ser regulada por factores ambientales. *Streptococcus cristatis* es capaz de modular, concretamente de reprimir, por este sistema de regulación, la expresión del gen *fimA* de *P. gingivalis* evitando su colonización.

Entre las bacterias, las principales moléculas empleadas para comunicarse son las acilhomoserina lactonas, que predominan en bacterias Gram-negativas, y oligopéptidos modificados en bacterias Gram-positivas (Miller y Bassier, 2001). Al mismo tiempo, las bacterias poseen un receptor que puede detectar específicamente el autoinductor respectivo. Cuando éste se une al receptor, activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor (Thomas y Nakaishi, 2006).

Además del “quorum-sensing”, otros reguladores globales como CsrA en *E. coli*, o CytR en *V. cholerae*, han demostrado que son determinantes importantes para el desarrollo de la biopelícula de estas bacterias. En *S. aureus*, Lasa y colaboradores (Lasa y col., 2005) han demostrado que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo de la biopelícula de esta bacteria, evidenciando que un regulador de virulencia es, a su vez, un regulador de la formación de la biopelícula, sirviendo de conexión entre ambos procesos.

Conjuntamente con la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación de la biopelícula. Así, por ejemplo, para *V. cholerae*, *Yersinia pestis* o *P. fluorescens* se han descrito proteínas implicadas en la formación de la biopelícula, indicando que estas moléculas son un transmisor secundario de señal común al proceso de regulación de la producción de exopolisacáridos en bacterias (Lasa y col., 2005).

### **1.5. INTERCAMBIO GÉNICO**

La emisión de señales no es la única manera de transferir información en las biopelículas. La alta densidad de células bacterianas que proliferan allí facilita el intercambio de información genética (ADN extracromosómico o plásmidos) entre bacterias de la misma especie y entre especies o, incluso, géneros distintos. Estudios recientes demuestran una tasa de transferencia génica mediada por plásmidos enormemente incrementada entre las bacterias de biopelículas, que sugiere que la redistribución de genes entre éstas es un proceso continuo con importantes consecuencias en su adaptación evolutiva (Post y col., 2004). La conjugación (o transferencia de plásmidos) y la transferencia de transposones ocurren en biopelículas de especies mixtas *in vivo* e *in vitro* (Donlan, 2002). Ghico y colaboradores (2001) han sugerido que especies bacterianas de relevancia médica como *E. coli*, que contienen plásmidos conjugativos, desarrollan biopelículas más fácilmente. La capacidad de transformación genética innata se ha descrito para la

mayoría de los estreptococos, con capacidad de integrar una variedad de plásmidos y ADN cromosómico (Kolenbrander y col., 2002). Ya que en muchas ocasiones los plásmidos contienen la información frente a la resistencia a agentes antimicrobianos, la asociación en biopelículas les proporciona además a las bacterias un poderoso mecanismo de defensa (Huang y col., 2011). Así, por ejemplo, Roberts y colaboradores (2001) han descrito, en un modelo de biopelícula oral, la transferencia del transposon conjugativo Tn916-like entre diferentes especies de estreptococos, transfiriéndose así la resistencia a tetraciclinas.

Además, las células lisadas en la biopelícula pueden actuar como donadoras de ADN cromosómico (Marsh y col., 2011).

### **1.6. RESISTENCIA BACTERIANA**

Como ya se ha comentado, las bacterias incluidas en una biopelícula presentan una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del hospedador. Las biopelículas, revestidas por la matriz extracelular y conteniendo múltiples microcolonias bacterianas en su interior, se convierten en estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmune. Por añadidura, la biopelícula provee de una barrera física que aumenta la resistencia de patógenos a las defensas del hospedador como la opsonización o lisis por complemento (Post y col., 2004). Aún así, las biopelículas provocan respuesta inmune celular y humoral, demostradas por la identificación de citoquinas liberadas por leucocitos expuestos a la biopelícula. Sin embargo, debido a su aislamiento del entorno por la matriz y su reducido estado metabólico, esta respuesta sistémica es muy pequeña (Donlan, 2002).

Otra ventaja, extremadamente importante desde el punto de vista clínico, es que las bacterias incluidas en biopelículas son muy resistentes a los antibióticos, siendo capaces de sobrevivir frente a concentraciones de antibiótico miles de veces superiores a las que toleran las bacterias planctónicas (Stewart y Costerton, 2001;

Huang y col., 2011). Para intentar explicar esta resistencia se han planteado diversas hipótesis:

- penetración lenta o incompleta del antibiótico en la biopelícula: se debería a que la matriz de exopolisacáridos constituye una barrera, impidiendo este ingreso. Si bien estudios *in vitro* muestran que algunos antibióticos logran ingresar con cierta facilidad (Lynch y col., 2007), se postula que el antibiótico podría ser desactivado por acción de polímeros extracelulares presentes en la matriz, y, por tanto, su difusión sería limitada dentro del mismo (Donlan, 2000; Stewart y Costerton, 2001; Fine y col., 2001; Donlan y Costerton, 2002; Socransky y Haffajee, 2003; Xu, 2004);
- dosis subletales: las bacterias serían capaces de desarrollar resistencia frente a los antimicrobianos al ser atacadas con dosis subletales (Donlan y Costerton, 2002; Socransky y Haffajee, 2003; Xu, 2004);
- causas metabólicas: una baja actividad metabólica de las bacterias dentro de la biopelícula por limitación de oxígeno y nutrientes puede causar que pasen a un estado de latencia o cese de su mitosis, con lo cual dejan de ser susceptibles a los antimicrobianos (Stewart y Costerton, 2001; Donlan y Costerton, 2002; Socransky y Haffajee, 2003; Xu, 2004). Además, se ha descrito la formación de nichos anaeróbicos en zonas profundas de las biopelículas debido a un consumo completo del oxígeno en las capas superficiales. Algunos antibióticos, como los aminoglicósidos, son comprobadamente menos eficaces contra la misma bacteria en condiciones anaeróbicas que aeróbicas. Finalmente, una eventual acumulación de productos ácidos en la biopelícula puede conducir a diferencias significativas de pH entre el exterior y el interior de ésta, interfiriendo con la acción del antibiótico (Stewart y Costerton, 2001; Post y col., 2004);

- cambios genéticos: se producirían modificaciones en la fisiología de las bacterias de la biopelícula que conllevarían la aparición de genes específicos, producto de cambios genéticos, que potenciarían mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos. Según diversos investigadores, esta resistencia se debería principalmente a modificaciones fenotípicas, como por ejemplo generar el cese de la mitosis. Por ende, la resistencia a antibióticos también podría inducirse mediante una situación de presión selectiva a una población; una vez que se producen los cambios genéticos descritos, las bacterias podrían transmitir los nuevos genes a través de transferencia horizontal (entre individuos) por intercambio de plásmidos; o igualmente producto de una conversión lisogénica (Donlan y Costerton, 2002; Socransky y Haffajee, 2003; Chole y Faddis, 2003; Scott y Manning, 2003; Post y col., 2004; Xu, 2004; Sanclement y col., 2005; Lynch y col., 2007);
- formación de esporas: esta hipótesis plantea la posibilidad de génesis de una subpoblación de bacterias dentro de la biopelícula con un estado fenotípico muy especial y altamente protegido, con una diferenciación similar al de las esporas. Este planteamiento es apoyado por investigaciones que muestran resistencia en biopelículas recientemente formadas, aun cuando estas son demasiado delgadas para constituir una barrera a la penetración de agentes antimicrobianos (Stewart y Costerton, 2001);
- fenómeno de “quorum-sensing”: el papel del sistema de señalización en la resistencia a antimicrobianos está siendo estudiado, aunque todavía no está clara su posible implicación. Davies y colaboradores (1998) presentaron datos que mostraban como biopelículas mutantes en el sistema de “quorum-sensing” (concretamente en el gen *LasI*) fueron anormalmente sensibles al tratamiento con SDS, aunque la cuestión de si estas biopelículas mutantes tenían la resistencia a antibióticos alterada no se abordó. Brooun

y Lewis (2000) mostraron que biopelículas mutantes defectuosas en la detección de este sistema de señalización veían afectada su resistencia a detergentes y antibióticos.

### **1.7. BIOPELÍCULAS E INFECCIONES**

El término infección hace referencia a la colonización de un organismo hospedador por microorganismos o especies exteriores. En la utilización clínica del término infección, el microorganismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y/o supervivencia del hospedador, por lo que se califica al microorganismo como patógeno.

Las enfermedades infecciosas durante el siglo pasado (difteria, tuberculosis, cólera, etc.) eran causadas por microorganismos dotados de mecanismos patogénicos específicos. Los antibióticos y vacunas desarrollados para estos patógenos lograron una notable eficacia en su control. En la actualidad, estos microorganismos han sido desplazados del primer plano por microorganismos ubicuos, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden de manera limitada a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Diversas publicaciones señalan que, por lo menos, el 65% de todos los procesos infecciosos bacterianos humanos podrían involucrar biopelículas (Potera, 1999; Sanclement y col., 2005; Ramadan y col., 2005 y 2006; Sanderson, 2006). Entre estas enfermedades destacan la caries, las enfermedades periodontales, la otitis media, la neumonía por *Pseudomonas* spp., la fibrosis quística, la cistitis crónica, la endocarditis bacteriana, la osteomielitis o la prostatitis crónica. También se ha demostrado que se pueden desarrollar biopelículas sobre distintos dispositivos médicos implantables, provocando infecciones, destacando la sepsis por catéteres endovenosos y arteriales. Además, se han descrito en catéteres urinarios, en sigmoidoscopios y en lentes de contacto. Constituyen, también, un problema relevante en válvulas cardíacas artificiales, marcapasos y prótesis ortopédicas, las cuales, una vez infectadas, generan

infecciones muy difíciles de resolver con el uso de antibióticos (Costerton y col., 1999; Costerton, 2001; Stewart y Costerton, 2001; Donlan, 2002).

Las características que mejor describen las infecciones relacionadas con las biopelículas son su cronicidad y su limitada respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas suelen ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biopelículas normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, y producen episodios recurrentes (Lasa y col., 2005). Como ya hemos comentado anteriormente, utilizando diferentes mecanismos, las bacterias pueden ser hasta mil veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en estado planctónico. Pero además, hay que tener en cuenta que los antibióticos que utilizamos rutinariamente han sido seleccionados por su actividad frente a bacterias planctónicas. Así, los ensayos de sensibilidad o susceptibilidad a los antimicrobianos (antibiogramas) que se realizan rutinariamente están diseñados para medir la susceptibilidad frente al antimicrobiano de la bacteria crecida de forma planctónica, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no ser extrapolables a esa misma bacteria cuando está creciendo en el interior de una biopelícula.

## **2. LA PLACA DENTAL COMO UNA BIOPELÍCULA BACTERIANA**

### **2.1. LA CAVIDAD ORAL, UN HÁBITAT MICROBIANO**

La boca es un hábitat cálido y húmedo, susceptible de ser colonizado por una gran variedad de microorganismos, que incluye virus, micoplasmas, arqueas, hongos, protozoos y bacterias, siendo este último grupo el más numeroso (Marsh y col., 2011).

En la cavidad oral se describen diferentes superficies de contacto donde establecerse los microorganismos y desarrollar biopelículas. El área superficial media de la cavidad oral de un adulto es aproximadamente 215 cm<sup>2</sup>, representada por los dientes (20% de la superficie) y las mucosas, con tejidos blandos tanto queratinizados (30%) como no-queratinizados (50%) (Mager y col., 2003).

En el caso concreto de los dientes, estos presentan una peculiaridad única en el cuerpo humano, y es que se trata de superficies rígidas y no descamativas expuestas en un medio muy rico en microorganismos, lo que facilita la formación de biopelículas (Figura 11), denominadas genéricamente placa dental o placa bacteriana (Lang y col., 2009). Según su localización, la placa dental se denomina:

- placa supragingival, localizada en la proximidad del margen gingival;
- placa subgingival, localizada en el interior del surco gingival o bolsa periodontal, bajo el margen de la encía;
- placa proximal, localizada en los espacios interproximales;
- placa de fosas y fisuras, localizada en las superficies oclusales.



**Figura 11.** Placa dental en adulto (flecha azul).

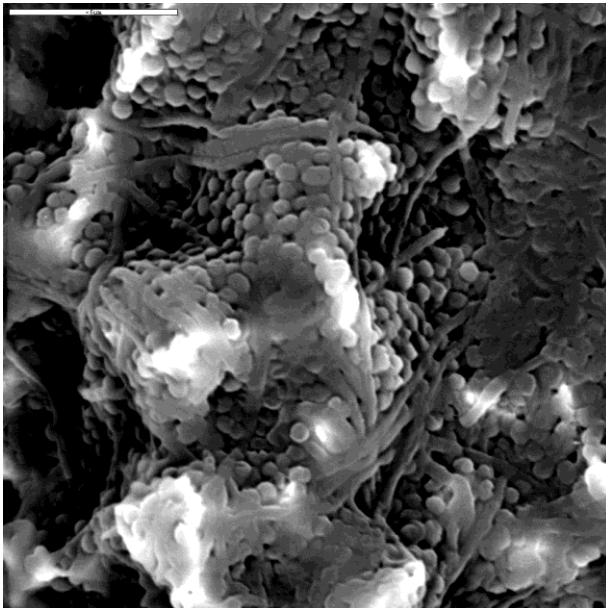
El concepto y descripción de la placa dental han ido evolucionando a lo largo de la historia, dependiendo de los avances técnicos disponibles para su estudio. La placa dental ha sido definida como una biopelícula, al ser una comunidad microbiana embebida en una matriz de polímeros de origen microbiano y salivar, constituida por una gran diversidad de microorganismos y que se localiza adherida a la superficie del diente (Marsh y Martin, 2009). Ya en 1684, Antonie van Leeuwenhoek, con la aparición del microscopio óptico, observó que la placa dental estaba compuesta por depósitos blandos con microbios y restos de comida, y comprobó que las bacterias asociadas a la superficie del diente presentaban propiedades diferentes comparadas con sus homólogas planctónicas. Únicamente era capaz de destruir las bacterias de su propia placa dental si previamente esta era recogida de sus molares y mezclada con una solución de vinagre *in vitro*, fallándole el tratamiento cuando se aplicaba la misma solución por lavados bucales prolongados (Marsh y col., 2011). Posteriormente, en 1898, Black definió la placa dental como placas blandas gelatinosas. A mediados de 1960, la placa dental comenzó a ser el foco de atención de la comunidad investigadora en el

ámbito dental, poniéndose énfasis en los factores contribuyentes a la diversidad de ecosistemas, incluyendo pH, potencial de oxido-reducción y requerimientos nutricionales (Thomas y Nakaishi, 2006). En 1970, en un congreso en Edimburgo, se definió la placa dental como microorganismos más polisacáridos extracelulares, recubierta por leucocitos, células epiteliales y restos de comida. A partir de 1990, gracias al desarrollo y perfeccionamiento del microscopio láser confocal y del microscopio electrónico de barrido, se llegó a un mejor conocimiento de la placa dental y de su estructura (Marsh, 1995 y 1997; Costerton y col., 1987 y 1993; Costerton, 1994; Donlan, 2002; Donlan y Costerton, 2002; Bernimoulin, 2003; Serrano-Granger y Herrera, 2005).

## **2.2. ARQUITECTURA DE LA PLACA DENTAL**

La estructura de la biopelícula oral presenta los tres elementos característicos ya detallados en el capítulo anterior: grandes colonias de microorganismos sésiles embebidas en una matriz polimérica extracelular y separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos (Figura 12).

Entre los diferentes ambientes que podemos encontrar en la cavidad oral, es posible reconocer una estructura similar de la placa bacteriana en sitios específicos. Esto ocurre en la placa de localización supragingival *versus* la placa de fisuras y surcos gingivales o bolsas periodontales de diferente profundidad, además de la localizada en superficies como reconstrucciones, prótesis e implantes. Parece por tanto que la estructura de la placa formada sobre ellos, como los patrones de crecimiento y maduración, no difieren significativamente (Theilade y col., 1982 a y b; Lang y col., 2009), por lo que, al menos, algunos de los mecanismos principales que interviene en la formación de la misma no guardan relación con la naturaleza de la superficie sólida colonizada. A pesar de las diferencias en cuanto a rugosidad superficial, energía libre o carga, las características más importantes de la estructura y del desarrollo de la placa son similares en todos estos materiales (Siegrist y col., 1991).



**Figura 12.** Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas de una biopelícula bacteriana madura, desarrollada en un sistema *in vitro* de biopelícula oral, sobre titanio. Se puede apreciar la estructura típica de una biopelícula, con los torrones celulares, la matriz y los espacios intersticiales huecos (barra escala = 5  $\mu\text{m}$ ).

Destacar únicamente que del estudio de la composición de la matriz extracelular (EPS, lípidos, restos celulares, ADN, etc.) se desprende que tres fuentes van a contribuir en la composición de la misma: los microorganismos de la placa (a través de la síntesis de EPS), la saliva y el exudado gingival. Las bacterias en degeneración o muertas también pueden contribuir a la matriz. Las diferencias descritas anteriormente en cuanto a la composición en EPS de la matriz en biopelículas también se hace patente en la placa dental. Se observan cambios en la composición de la misma en función de la localización dentro de la cavidad oral y de las especies bacterias predominantes en ese momento en la biopelícula. Podemos destacar, entre los EPS de la placa mejor caracterizados, a los polisacáridos fructanos (levanos) y glucanos, ambos obtenidos a partir de la sacarosa de la dieta y que constituyen la reserva de energía disponible para los microorganismos de la biopelícula (levano y dextrano) o actuando como esqueleto de la matriz (mutano). Además podemos encontrar una pequeña cantidad de lípidos (Lang y col., 2009).

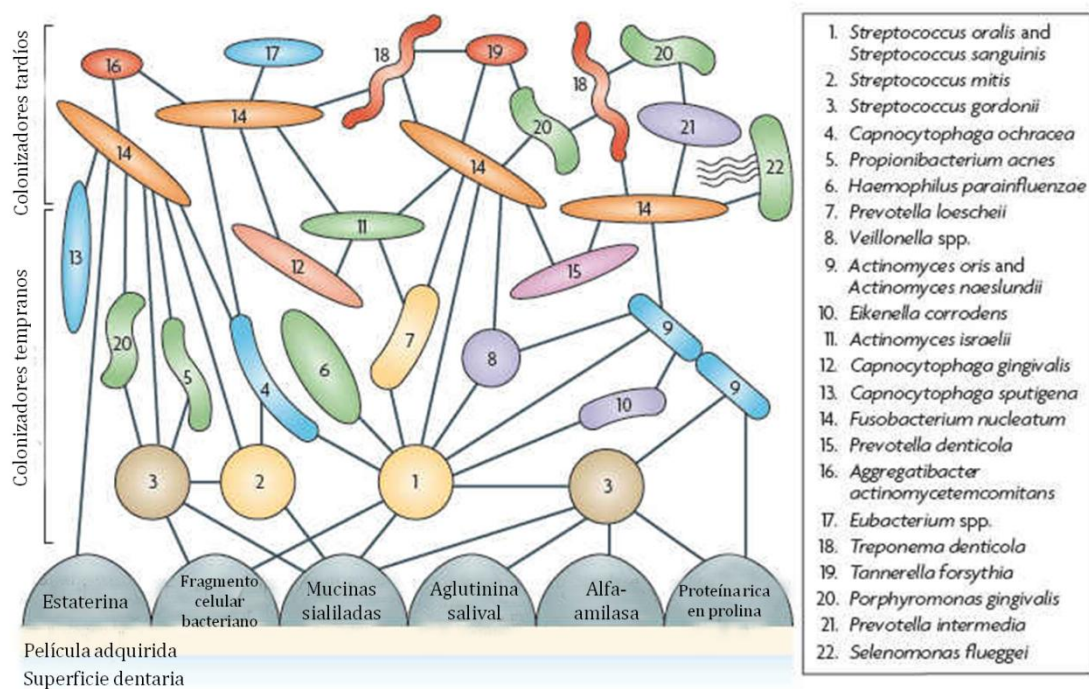
### 2.3. DESARROLLO DE LA PLACA DENTAL

El desarrollo de la placa dental sigue las pautas generales en todo proceso de formación de biopelículas, ya descritas en el capítulo anterior; el proceso comprende unas etapas comunes de adhesión y agregación, producción de una matriz extracelular, comunicación intercelular y generación de heterogeneidad.

La formación de la placa dental comienza con la adsorción de macromoléculas hidrófobas a las superficies del diente, para formar una película condicionante denominada película adquirida (Figura 13). La composición de esta película incluye principalmente glucoproteínas salivales (mucinas) y anticuerpos. Estas moléculas derivan mayoritariamente de la saliva, pero, en la región subgingival, también proceden del fluido gingival crevicular (Marsh y col., 2011). Esta película altera la carga y la energía libre de la superficie, aumentando así la eficiencia de la adhesión bacteriana (Kolenbrander y col., 2002).

A continuación, algunas bacterias, en su mayoría transportadas pasivamente a la superficie a colonizar por la saliva o el fluido gingival crevicular, comenzarán a adherirse de forma reversible a la película adquirida (Marsh y col., 2011). Tanto el inicio como la posterior asociación de especies bacterianas implicadas en el desarrollo de la biopelícula oral no será un proceso aleatorio, sino que existirían asociaciones específicas entre bacterias dentro de la misma (Figura 13) (Kolenbrander y col., 2002 y 2010; Socransky y Haffajee, 2003). La colonización primaria está dominada por cocos Gram-positivos anaerobios facultativos, más algunas células epiteliales y leucocitos polimorfonucleares. Las bacterias implicadas serán capaces de desarrollar diferentes mecanismos que les permitan adherirse rápidamente al entrar en contacto con la película adquirida, como estructuras de adhesión específicas (fimbrias, fibrillas, etc) y polímeros extracelulares (Huang y col., 2011). Así, colonizadores primarios como *Actinomyces naeslundii* y varias especies de estreptococos, como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis* y *Streptococcus mitis*, muestran fimbrias y fibrillas en su

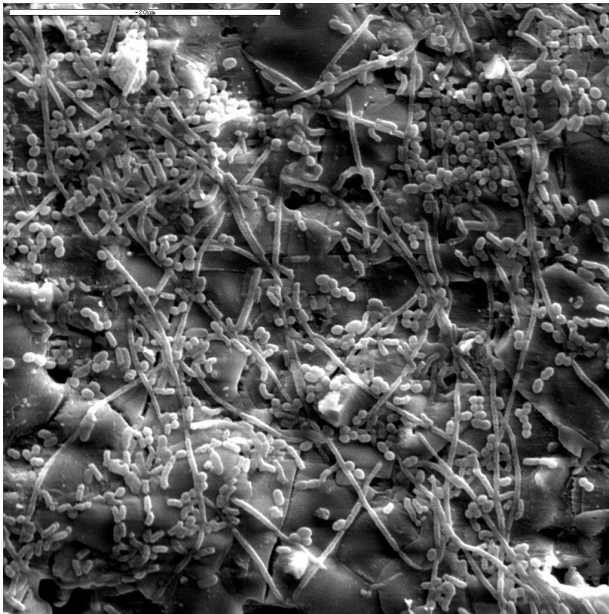
superficie. Otros factores que favorecen la adhesión de las bacterias orales a una superficie son la capacidad de motilidad que muestran algunas especies bacterianas o la expresión de ciertas proteínas en su superficie celular, denominadas adhesinas, como, por ejemplo, la adhesina GalNAc $\beta$ 1-3 de las especies *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguis* (Kolenbrander y col., 2002).



**Figura 13.** Modelo espacio-temporal de colonización bacteriana bucal, adaptado de Kolenbrander y col., 2010, que ilustra la forma en que las bacterias colonizadoras iniciales o primarias reconocen los receptores de la película adquirida y las coagregaciones entre colonizadores iniciales, fusobacterias y colonizadores tardíos de la superficie dentaria.

En la Figura 14 podemos observar bacterias en las primeras horas de formación de una biopelícula oral desarrollada *in vitro*, como microorganismos únicos o en agregados. La unión de estas especies pioneras, que inicialmente se lleva a cabo a través de interacciones físico-químicas débiles reversibles, se tornará permanente a través de interacciones estereoquímicas fuertes (Do y col.,

2013). Durante las primeras horas de formación, estas bacterias comienzan a proliferar y forman colonias pequeñas. Sin embargo, dado que otros tipos de microorganismos también pueden proliferar en una región adyacente, la película comienza a adquirir una mezcla de microorganismos, creciendo la complejidad.

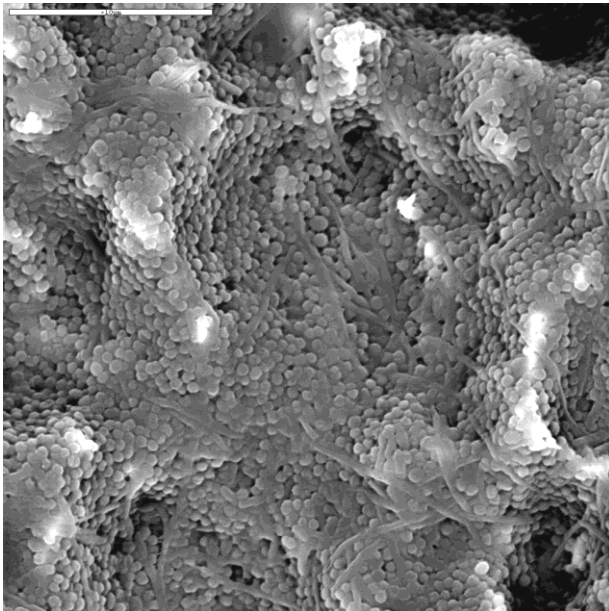


**Figura 14.** Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas, que muestra el primer estadio de la formación de una biopelícula oral desarrollada en un sistema *in vitro* sobre el material de hidroxiapatita. Se puede apreciar una población de bacterias, entre las que destacan la morfología cocoide, cocobacilar y fusiforme, como células individuales o pequeñas colonias (barra escala = 20  $\mu\text{m}$ ).

Al aumentar el espesor de la biopelícula en formación, debido a la proliferación continua de los microorganismos adheridos, a la adhesión de nuevas bacterias y a la síntesis de polímeros extracelulares, la difusión en los dos sentidos de la biopelícula es cada vez más difícil. Las bacterias de las capas más superficiales utilizan rápidamente el oxígeno y la difusión de este será deficiente a través de la matriz de la biopelícula, generándose un gradiente de oxígeno y creándose condiciones de anaerobiosis total en las capas más profundas. Así mismo, se generan gradientes decrecientes de nutrientes provistos por la fase acuosa, esto es, la saliva. Como resultado del metabolismo bacteriano aparecerán gradientes inversos de productos de fermentación.

Ahora, los bacilos Gram-positivos, presentes al principio en muy bajo número, aumentan gradualmente su presencia, sobre todo las especies de *Actinomyces*, que predominan en esta etapa de la formación de la placa. Los

receptores de superficie de los cocos y los bacilos Gram-positivos agregados permiten la adhesión ulterior de los microorganismos Gram-negativos, con menor capacidad de adherencia directa a la película. *Veillonella* spp., las fusobacterias y otras especies bacterianas Gram-negativas anaerobias caracterizan esta fase. La heterogeneidad de la placa aumenta gradualmente, incluyendo grandes cantidades de microorganismos Gram-negativos. El resultado de esta evolución es un conjunto complejo de especies bacterianas interrelacionadas, estructural y funcionalmente organizado (Figura 15).



**Figura 15.** Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas, que muestra la estructura madura de una biopelícula oral desarrollada en un sistema *in vitro* sobre titanio. Se puede apreciar una densa población de bacterias organizadas en biopelícula (barra escala = 10  $\mu$ m).

### 2.4. COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LA PLACA DENTAL

La mayoría de los ecosistemas naturales contienen un gran número de microorganismos genéticamente distintos, y la cavidad bucal humana no es diferente. Numerosos estudios han abordado la descripción de la composición microbiana de la placa dental, tanto en individuos en estado de salud como en situación de enfermedad, describiendo la presencia de cientos de microorganismos organizados en comunidad (Ximenez-Fyvie y col., 2000; Aas y col., 2005; Paster y col., 2006). Actualmente, no se puede determinar con exactitud el número de

especies bacterianas presentes, ya que este va aumentando a medida que los avances en técnicas moleculares permiten una identificación más específica (Socransky y col., 2004; Rasiah y col., 2005; Ledder y col., 2007; Keijser y col., 2008). Los análisis moleculares de las comunidades microbianas orales mediante clonación y secuenciación del gen 16S *rRNA* han sugerido la presencia de aproximadamente 800 especies de bacterias habitando la boca, y que entre 100 y 200 especies diferentes conviven en la cavidad bucal de un individuo sano (Kolenbrander y col., 2010; Dewhirst y col., 2010; Filoche y col., 2010). Este número puede diferir entre unos y otros estudios en función, principalmente, del método de análisis aplicado. Así, por ejemplo, mediante la tecnología de pirosecuenciación se ha sugerido que la diversidad bacteriana puede alcanzar los 1200 taxones diferentes y hasta 500 especies presentes en individuos sanos (Keijser y col., 2008; Zaura y col., 2009; Kolenbrander y col., 2010). Pero, en lo que sí coinciden todos los estudios es en reflejar la grandísima diversidad bacteriana presente en este pequeño nicho.

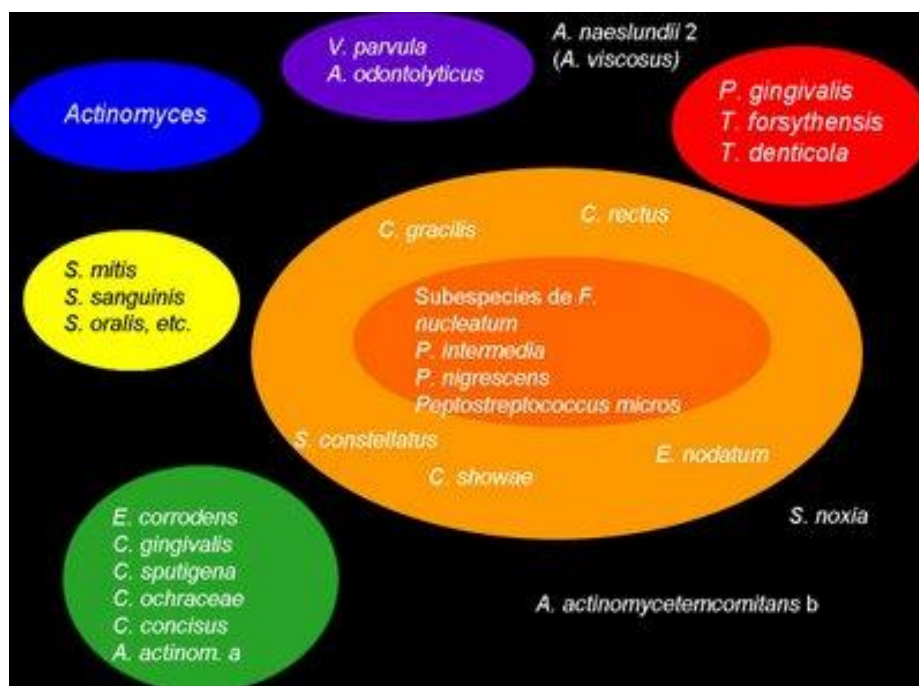
En la cavidad bucal es posible reconocer una composición muy similar de la placa bacteriana en las diferentes localizaciones (supragingival, subgingival, además de la localizada en superficies como reconstrucciones, prótesis e implantes), solamente hallando variaciones considerables en los microorganismos predominantes detectados, debido en gran parte a la estrecha relación entre las propiedades del hábitat y los organismos que son capaces de predominar (Ximenez-Fyvie y col., 2000; Mager y col., 2003; Aas y col., 2005; Paster y col., 2006; Socransky y Haffajee, 2009; Marsh y col., 2011).

Pese a la altísima diversidad microbiana de las biopelículas orales, podemos destacar la presencia de un determinado grupo de bacterias que caracterizan la composición de las mismas. Socransky y colaboradores (1998) demostraron la presencia de grupos microbianos específicos dentro de la placa bacteriana (Figura 16). Se reconocieron seis grupos de especies bacterianas íntimamente asociadas.

## Introducción

---

Por un lado, los colonizadores iniciales de la superficie dentaria, que incluían especies de *Actinomyces*, un complejo amarillo compuesto por miembros del género *Streptococcus*, un complejo verde compuesto por especies de *Campylobacter*, el serotipo a de *A. actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter concisus* y un complejo violeta compuesto por *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*. Estos grupos suelen preceder a la multiplicación predominante de los complejos rojo y naranja de Gram-negativos. El complejo naranja está compuesto por *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, subespecies de *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Streptococcus constellatus*, mientras que el complejo rojo está compuesto por *Tannerella forsythia*, *P. gingivalis* y *Treponema denticola* (Figura 16).



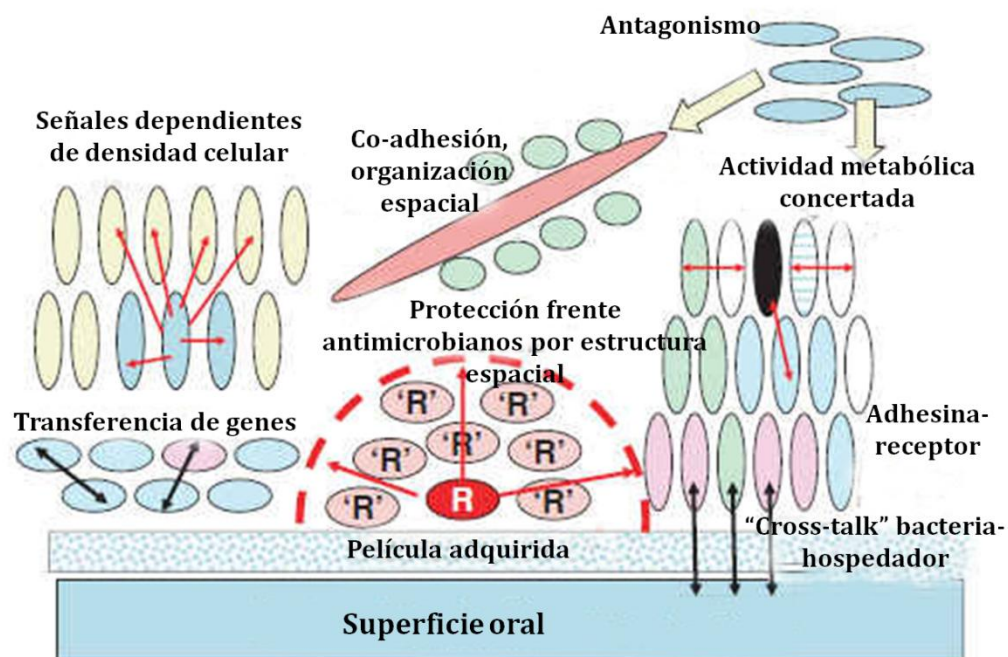
**Figura 16.** Esquema de la asociación entre especies subgingivales (adaptado de Socransky y col., 1998).

De los seis grupos de especies bacterianas mencionados anteriormente, la mayoría de las bacterias predominan tanto en los estados de salud como en los de enfermedad, aunque los recuentos, las proporciones y la prevalencia varían debido a las condiciones físicas y biológicas que prevalecen en las distintas localizaciones (Ximenez-Fyvie y col., 2000; Aas y col., 2005; Paster y col., 2006; Filoche y col., 2010).

La carga microbiana de la mucosa es relativamente baja debido a la descamación, a pesar de que las biopelículas con una mayor densidad y diversidad microbiana se encuentran en la superficie altamente papilosa de la lengua. En contraste, los dientes permiten la acumulación de la mayor cantidad de biomasa al ser superficies no descamativas; las cifras más altas y la mayor diversidad de microorganismos se encuentran en los sitios de estancamiento que ofrezcan protección contra las fuerzas de eliminación orales. Las fisuras en las superficies oclusales tienen un alto número de bacterias aerobias, anaerobias facultativas y sacarolíticas Gram-positivas, especialmente estreptococos, y hay pocos microorganismos anaerobios Gram-negativos. En contraste, el surco gingival tiene las proporciones más altas de las bacterias proteolíticas y anaerobias obligadas, muchos de los cuales son Gram-negativos. La saliva contiene hasta  $10^8$  microorganismos por mililitro que derivan de otras superficies orales, especialmente la lengua (Marsh y Martin, 2009; Marsh y col., 2011). En una boca sana, los recuentos de microorganismos correspondientes a la placa supragingival pueden ser mayores que  $10^9$  en la superficie de un solo diente, y entre  $10^3$ - $10^8$  en los sitios subgingivales, en función de que sean surcos poco profundos o bolsas periodontales profundas (Socransky y Haffajee, 2009).

## **2.5. INTERACCIÓN ENTRE MICROORGANISMOS, COMUNICACIÓN CÉLULA A CÉLULA Y TRANSFERENCIA DE GENES EN LA PLACA DENTAL**

En las biopelículas, los microorganismos están físicamente muy próximos los unos a los otros, e interactúan en consecuencia (Figura 17).



**Figura 17.** Representación esquemática de los tipos de interacción (inter-bacterianas y bacterias-hospedador) que se producen en una comunidad microbiana, como la placa dental, creciendo como biopelícula (adaptado de Marsh y col., 2011). Las bacterias se adhieren a través de interacciones adhesina-receptor o bien a la película adquirida (derivada de la saliva o del fluido del surco gingival) o a células ya unidas (co-adherencia). Las bacterias interactúan sinérgicamente para metabolizar moléculas endógenas (por ejemplo, glicoproteínas). Las bacterias se comunican entre sí a través de moléculas señalizadoras difusibles, y con células del hospedador. Las células son más tolerantes a los agentes antimicrobianos, ya sea a causa de los atributos físicos de la biopelícula, a través de la transferencia de genes de resistencia o a través de protección por las células vecinas que producen enzimas neutralizantes. Las células también pueden obtener una ventaja por la producción de moléculas inhibitoras.

Entre las bacterias orales se han descrito interacciones metabólicas convencionales tanto de sinergismo como de antagonismo. Hay ejemplos claros de interacciones de sinergismo: el producto metabólico de un organismo se convierte en el nutriente principal para un segundo; las bacterias colaboran para catabolizar moléculas complejas del hospedador (proteínas, glicoproteínas, etc); bacterias anaerobias obligadas tales como *P. gingivalis* pueden sobrevivir en entornos

aeróbicos si se asocian y co-agregan con géneros que consumen oxígeno tales como *Neisseria*. En el sentido opuesto, también se ha descrito la producción de compuestos inhibidores (bacteriocinas, ácidos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etc) para inhibir el crecimiento de determinadas células vecinas (Marsh y col., 2011). Además, se han descrito otros fenómenos metabólicos de señalización inter-bacteriana, como el aumento de la expresión de la  $\alpha$ -amilasa por *Streptococcus gordonii* en presencia de *Veillonella atypica* o, como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, una menor tasa de formación de biopelícula para *P. gingivalis* en presencia de *S. cristatus*, que a través de una proteína de la superficie puede reprimir los genes implicados en la expresión de las fimbrias de *P. gingivalis* (Marsh y col., 2011).

Igualmente, el fenómeno de “quorum-sensing” ha sido descrito para las bacterias de la placa, aunque con alguna diferencia con respecto a las generalidades descritas en el capítulo anterior y es que estudios de este fenómeno en bacterias periodontales Gram-negativas sugieren que estos microorganismos no poseen como principal molécula autoinductora las acilhomoserina lactonas, que predominan en bacterias Gram-negativas del medio ambiente (Frías y col., 2001). En su lugar, estas bacterias Gram-negativas (por ejemplo, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*) y varios géneros de bacterias orales Gram-positivas poseen como molécula clave el autoinductor denominado IA-2, que es codificada por el gen *LuxS* (Marsh y col., 2011). En *A. actinomycetemcomitans*, la señalización dependiente del gen *LuxS* induce la expresión de la leucotoxina y de una proteína de transporte involucrada en la adquisición de hierro, mientras que en *P. gingivalis*, la detección de “quorum-sensing” dependiente de *LuxS* modula actividades de hemaglutininas y proteasas, pero no es esencial para virulencia (Marsh y col., 2011). Incluso, se ha podido observar cómo la ausencia en algunas bacterias del AI-2 puede ser complementada por las moléculas producidas por otra (pero no todas) las especies. Por ejemplo, el AI-2 producido por *A. actinomycetemcomitans* complementa una mutación en el gen *luxS* de *P. gingivalis* y la secreción de AI-2 de

*P. gingivalis* podría estimular la formación de biopelículas por *F. nucleatum*, lo que sugiere un papel importante para estas moléculas en la comunicación intra-e inter-especies (Marsh y col., 2011). Hay descritas otras moléculas involucradas en “quorum-sensing” de bacterias orales: en *Streptococcus mutans*, la detección de “quorum-sensing” está mediada por un péptido estimulante de competencia (CSP, por sus siglas en inglés), que aumenta la tasa de crecimiento en biopelícula entre 10 y 600 veces (Li y col., 2002).

Las bacterias orales también se comunican e interactúan unas con otras en las biopelículas mediante transferencia horizontal de genes. Por ejemplo, la transferencia de transposones conjugativos que codifican resistencia a la tetraciclina entre los estreptococos ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro*, o la transferencia de genes entre *T. denticola* y *S. gordonii*. La presencia de islas de patogenicidad en patógenos periodontales, tales como *P. gingivalis*, es también prueba indirecta de la transferencia horizontal de genes que tiene lugar en biopelículas de la placa en algún tiempo lejano en el pasado, y puede explicar la evolución de cepas más virulentas. Además, las células lisadas en las biopelículas podrían actuar como donantes de ADN cromosómico, con lo cual aumenta la oportunidad de transferencia horizontal de genes en la placa dental (Marsh y col., 2011).

### **3. PLACA DENTAL Y ENFERMEDAD**

Una vez que la biopelícula oral se ha formado, la composición microbiana de la misma se caracteriza por presentar un alto grado de estabilidad o de equilibrio, a pesar de las tensiones ambientales a las que es sometida regularmente, como la higiene bucal periódica, la ingesta de alimentos o los cambios diurnos en el flujo de saliva (Marsh y col., 2011). Las bacterias responden a estos cambios ambientales a través de los mecanismos anteriormente descritos de interacciones microbianas, incluyendo acciones de sinergismo y antagonismo. Pero, en ocasiones, la homeostasis microbiana puede romperse si un parámetro clave para la estabilidad

de esa comunidad supera un umbral. Una consecuencia de la alteración de la homeostasis es la reorganización de la estructura y la composición de la comunidad microbiana, y es que especies que hasta el momento estaban en menor proporción se hacen más dominantes. Este cambio en la composición de la comunidad y actividad puede predisponer a la enfermedad (Marsh y col., 2011).

Se ha descrito como la placa dental tiene profundas implicaciones en la etiología y progresión de algunas de las enfermedades más prevalentes que afectan a los humanos, como son la caries dental y las enfermedades periodontales (Filoche y col., 2010; Do y col., 2013). La prevalencia de estas enfermedades orales es muy elevada en los países desarrollados y tiene un gran impacto económico, demandando recursos médicos y sociales enormes en la prestación sanitaria en todo el mundo: por ejemplo, en el caso de la caries dental, en muchos países alrededor del 80% de la población se ve afectada (Do y col., 2013); en el caso de la periodontitis, y concretamente en España, según la Encuesta Nacional de Salud en España en 2005, cerca del 40% de las personas entre 65-74 años tendrían lesiones evidentes de periodontitis, y en el grupo etario entre 35-44 años la proporción sería superior al 25% (ENSE, 2005). Por añadidura, las biopelículas y entre ellas los orales, se relacionan con infecciones de carácter crónico, las cuales tienen un fuerte impacto en la calidad de vida, así como para la salud sistémica. Las infecciones crónicas orales han sido asociadas con, entre otras enfermedades, diabetes, enfermedades cardiovasculares, úlceras de estómago o cáncer gástrico (Do y col., 2013).

### **3.1. PLACA DENTAL E INFECCIONES**

Entre las principales enfermedades relacionadas con la placa dental destacan la caries dental, las enfermedades periodontales y las enfermedades peri-implantarías, que se describen a continuación por su importancia y prevalencia. Hay otras patologías en las que la biopelícula oral también está implicada en el inicio y progresión, como la infección pulporeriapical, halitosis, etc.

### **Caries dental**

El término de caries dental se utiliza para describir el resultado -signos y síntomas- de la disolución química localizada de la superficie del diente, causada por la actividad metabólica de las bacterias ubicadas en la biopelícula oral (o placa dental) que cubre el área afectada (Fejerskov y col., 2008) (Figura 18).



**Figura 18.** Caries dental en adulto.

El papel de la biopelícula oral como factor etiológico de esta enfermedad se asignó desde el comienzo de su estudio. Ya en 1882, Walter Miller propuso como factor más importante en la patogenia de la misma la capacidad de un gran número de bacterias bucales de producir ácidos a partir de los hidratos de carbono de la dieta. Más adelante, en 1960, Paul Keyes estableció que la etiopatología de la caries obedecía a la interacción simultánea de tres elementos o factores principales: los microorganismos de la biopelícula oral, el sustrato y el diente. A partir de los años ochenta se incluirán el factor tiempo y los factores de riesgo. En 2004, Fejerskov (2004) la denominó como una enfermedad infecciosa que se origina como la consecuencia de cambios ecológicos que se producen en la placa dental,

conformada por microorganismos autóctonos y no por microorganismos patógenos oportunistas.

En la actualidad, la caries está considerada como una enfermedad infecciosa compleja, transmisible y multifactorial, que causa la destrucción localizada de los tejidos dentales duros por los ácidos generados por las comunidades microbianas adheridas al diente. Las lesiones son el resultado de la disolución del esmalte o cemento y posteriormente de la dentina, por los ácidos producidos por los microorganismos al metabolizar los hidratos de carbono de la dieta, consecuencia de un cambio en la ecología y actividad metabólica de la biopelícula. No obstante, es importante destacar que la biopelícula oral que se forma y crece ubicuamente en las superficies duras de la cavidad oral no va a conducir necesariamente al desarrollo de caries dentales clínicamente visibles. Sin embargo, será un requisito para que se produzca la caries (Marsh y Nyvad, 2008).

Se ha intentado describir la microbiota asociada con el desarrollo de la caries. Durante muchos años, se han mantenido dos corrientes sobre el papel de la placa dental en la etiología de la caries. La “*hipótesis de placa específica*” proponía que, a pesar de la gran variedad microbiana presente en la placa dental, solo un microorganismo o un número reducido de ellos, estaban involucrados en la enfermedad. En contraste, la “*hipótesis de placa no específica*” consideraba que la enfermedad se debía a la actividad del conjunto de los microorganismos presentes en la placa (Marsh y Nyvad, 2008). Recientemente, se ha propuesto una hipótesis alternativa (“*hipótesis de la ecología de la placa*”), que recoge los elementos clave de las dos hipótesis (Marsh, 1994 y 2003). Esta propone que la enfermedad resulta de un cambio en el balance de la microbiota residente como consecuencia de un cambio en las condiciones ambientales locales. En el caso de la caries dental, situaciones con continuas bajadas de pH y un consumo frecuente de azúcar podría favorecer el crecimiento de especies bacterianas acidogénicas y acidúricas y, por tanto, predisponer una localización a la caries.

Habitualmente, las bacterias acidogénicas y acidúricas forman parte de la biopelícula oral, pero a pH neutro, estas bacterias son poco competitivas y se encuentran en bajas concentraciones frente al total de microorganismos de la biopelícula. En esta situación, la producción de ácidos, por parte de estas bacterias, es clínicamente insignificante o puede ser contrarrestado por otras bacterias, estando los procesos de demineralización y remineralización en equilibrio. Si la frecuencia de consumo de carbohidratos fermentables se incrementa y/o el flujo salival está dañado, la biopelícula mantendrá más tiempo el pH por debajo del punto crítico para el proceso de demineralización (aproximadamente pH 5,5). Además, esta situación favorecerá la proliferación de bacterias acidogénicas y acidúricas (especialmente *S. mutans* y lactobacilos, pero no exclusivamente), lo que conlleva a una mayor producción de ácidos y, por tanto, de demineralización (Marsh y Nyvad, 2008).

Para que una bacteria oral pueda ser considerada que juega un papel en el desarrollo de la caries, debe poseer ciertas características promotoras de caries (Loesche, 1986), que incluyen:

- la capacidad de utilizar rápidamente azúcares fermentables, en competición con otras bacterias de la placa dental, y transformarlos en ácidos. Un ejemplo es *S. mutans*, con numerosos sistemas de transporte de azúcares;
- la capacidad de mantener el metabolismo del azúcar bajo condiciones ambientales extremas, como a pH bajos. Muy pocas bacterias son capaces de soportar condiciones ácidas por períodos prolongados de tiempo; sin embargo, especies de los géneros estreptococo y lactobacilo no solo mantienen su viabilidad a pH bajos, sino que esta situación favorece su crecimiento. Esta capacidad se debe a su capacidad de mantener un ambiente intracelular favorable, la posesión de enzimas con una zona de trabajo óptima a pH ácido, y la producción de proteínas específicas de respuesta a estrés ácido;

- la producción de polisacáridos extracelulares y polisacáridos intracelulares (IPS). Los EPS incluyen glucanos y fructanos, que, además de dar soporte estructural a la biopelícula, ayudan a acumular ácidos en sitios concretos y actúan como fuente de carbohidratos en situaciones de escasez. Los IPS podrán ser usados por las bacterias para la producción de energía y convertirlos en ácidos cuando no están disponibles azúcares en la cavidad oral, y de esta manera mantener períodos de pH bajos en la biopelícula.

Como se ha comentado, otros factores van también a contribuir al desarrollo de la caries. Por un lado, pueden existir determinadas características anatómicas que influyan en que un diente o superficie dentaria sea más susceptible a la caries (las fosas y fisuras pueden ser más profundas y estrechas o presentar defectos morfológicos; una incorrecta disposición de los dientes en las arcadas; la presencia de aparatos fijos o removibles de ortodoncia o de prótesis, etc). Junto a los dientes, la saliva es otro factor implicado en la etiología de la enfermedad. Esta representa un papel protector, ya que ejerce una labor de autolimpieza y aclaramiento, tiene una alta capacidad tampón, influye en la remineralización por su alto contenido en calcio y fosfato y es rica en factores antimicrobianos (inmunoglobulinas, lisozimas, etc). Una reducción de la secreción salivar provocará cambios en la microbiota oral, que junto con la disminución de su papel protector, aumenta el riesgo de caries. Y, finalmente, otro facto relevante es la dieta: ya se ha detallado el papel crucial de los hidratos de carbono, y especialmente los azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa y lactosa) en el inicio y desarrollo de la enfermedad.

### **Enfermedades periodontales**

La placa dental juega un papel fundamental en el inicio y progresión de estas enfermedades. Las enfermedades periodontales son infecciones causadas por microorganismos que colonizan la superficie dentaria, o placa dental, en el margen gingival o por debajo de él, afectando a los tejidos de soporte del diente, el periodonto (Figura 19).



**Figura 19.** Periodontitis crónica.

La Tabla 1 muestra la clasificación de las enfermedades que afectan al periodonto, atendiendo a lo establecido en el “International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions” de 1999 (Armitage, 1999).

**Tabla 1. Clasificación de las enfermedades y lesiones periodontales establecidas en el “International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions” de 1999 (Armitage, 1999).**

<b>I. Enfermedades gingivales</b>	<b>V. Enfermedades periodontales necrosantes</b>
Enfermedades gingivales inducidas por placa*	Gingivitis ulcerativa necrosante
Enfermedades gingivales no inducidas por placa	Periodontitis ulcerativa necrosante
<b>II. Periodontitis crónica</b>	<b>VI. Abscesos del periodonto</b>
Localizada	Absceso gingival
Generalizada	Absceso periodontal
	Absceso pericoronario
<b>III. Periodontitis agresiva**</b>	<b>VII. Periodontitis relacionadas con lesiones endodónticas</b>
Localizada	Lesión endodóntica-periodontal
Generalizada	Lesión periodontal-endodóntica
	Lesión combinada
<b>IV. Periodontitis como manifestaciones de enfermedades sistémicas</b>	<b>VIII. Malformaciones y lesiones congénitas o adquiridas</b>

\*Estas enfermedades pueden presentarse en un periodonto que no perdió inserción o en uno con pérdida de inserción estabilizada y que no avanza.

\*\*La periodontitis agresiva también puede clasificarse según su extensión e intensidad.

La búsqueda de los agentes etiológicos de las enfermedades periodontales ha ido progresando durante más de un siglo. Hasta mediados de la década de 1960, se mantenía una corriente de pensamiento a la que se denominó “*hipótesis de la placa no específica*” que postulaba como causa de las enfermedades periodontales a algún defecto constitucional del paciente, al trauma oclusal, a la atrofia por desuso o a alguna combinación de estos factores. Se consideraba que las bacterias no eran más que invasores secundarios en este proceso o que, a lo sumo, contribuían a la inflamación observada en la destrucción periodontal (Lang y col., 2009). Si bien los microorganismos se acumulaban en el margen gingival o por debajo de él produciendo ácidos, endotoxinas y antígenos que conducían a la inflamación, que a su vez ocasionaba destrucción del tejido periodontal, se pensaba que las bacterias desempeñaban un papel de agentes causales inespecíficos en la etiología de la periodontitis.

Más tarde, varios estudios realizados a finales de 1960 sugirieron la idea de la especificidad en la etiología microbiana de las enfermedades periodontales. Se aceptó, en términos generales, que la placa bacteriana estaba vinculada de algún modo con las enfermedades periodontales en humanos. Se pensaba que el hecho desencadenante de mayor importancia en la periodontitis era el aumento de volumen de la placa bacteriana, posiblemente acompañado por una disminución de la resistencia del hospedador. Una serie de investigaciones condujeron al reconocimiento de las diferencias de composición de la placa bacteriana entre un individuo y otro, y entre distintos sitios del mismo individuo (Lang y col., 2009). Se demostró que la composición microbiana de la placa subgingival tomada de localizaciones clínicamente afectadas difería sustancialmente de la de las muestras obtenidas de localizaciones sanas en sujetos con periodontitis juvenil localizada (ahora denominada, agresiva localizada) (Newman y col., 1976; Slots, 1976). Se reconoció que no todos los tejidos inflamados (gingivitis) evolucionaban hacia una destrucción tisular activa con pérdida de inserción (periodontitis), asumiéndose la “*hipótesis de la placa específica*”. Esta sugiere que solo ciertos microorganismos de

la placa son patógenos, y que la patogenicidad depende del sobrecrecimiento o selección de los microorganismos más virulentos, proponiendo como posibles patógenos a algunos de los microorganismos hallados regularmente en las lesiones periodontales en concentraciones elevadas en comparación con las observadas en situaciones de salud clínica. Según esta teoría, la periodontitis sería el resultado de noxas celulares causadas por patógenos específicos, las que provocarían respuestas inflamatorias e inmunes del hospedador (Thomas y Nakaishi, 2006).

La etiología de las enfermedades periodontales se considera, hoy en día, como multifactorial. El factor primario son los patógenos periodontales. Los microorganismos causantes de las enfermedades periodontales residen en las biopelículas depositadas sobre los dientes o sobre las superficies epiteliales. Las relaciones ecológicas entre la flora microbiana periodontal y su hospedador son, en términos generales, benignas. En muchos individuos no se percibe daño de las estructuras de sostén dentario en ningún momento. Sin embargo, en ocasiones, estos microorganismos participan en la iniciación y progresión de la enfermedad. Se piensa que la progresión de la periodontitis depende de la existencia simultánea de varios factores (Socransky y Haffajee, 1992 y 1993). El hospedador debe ser susceptible, tanto desde el punto de vista sistémico como local. El medio local debe contener especies bacterianas que promuevan la infección o que, al menos, no inhiban la actividad del patógeno y, además, tiene que conducir a la expresión de los factores de virulencia del patógeno. Numerosos factores ambientales o del hospedador repercuten sobre la iniciación y la velocidad de progresión de las enfermedades periodontales. Estos factores incluyen defectos en la cantidad o la función de los leucocitos polimorfonucleares, respuestas inmunitarias mal reguladas, el hábito de fumar, la dieta y diversas enfermedades sistémicas (Socransky y Haffajee, 2009).

Para que un patógeno periodontal cause enfermedad es esencial que sea capaz de colonizar el área subgingival. Para colonizar localizaciones subgingivales (Socransky y Haffajee, 2009), una especie debe:

- adherirse a una o más superficies disponibles, como por ejemplo el diente (o sustancias unidas al diente), el surco, el epitelio de la bolsa o a otras especies bacterianas adheridas a esas superficies, esto es, a la biopelícula bacteriana;
- multiplicarse: el surco gingival y la bolsa periodontal constituyen un medio poco favorable para las especies bacterianas que lo habitan. La temperatura de esta zona oscila entre los 30 y 38°C (Haffajee y col., 1992), con lo que microorganismos termófilos y psicrófilos tienen dificultad en colonizar esta área. El pH es bastante restringido (7,0-8,5) y para numerosas especies microbianas este rango es inaceptable (Cimasoni, 1983). El ambiente físico selectivo del área del surco gingival se acompaña de una disponibilidad limitada de nutrientes, cuya fuente son: la dieta, el hospedador y otras especies subgingivales;
- competir satisfactoriamente contra otras especies que deseen ese hábitat;
- superar los mecanismos de defensa del hospedador. Para colonizar un sitio subgingival una especie bacteriana debe superar varios obstáculos provenientes del hospedador entre los que figuran:
  - el flujo de saliva y el líquido gingival así como el desplazamiento mecánico provocado por la masticación y la fonación;
  - los anticuerpos específicos, glucoproteínas salivales, mucinas y prolina rica en proteínas que contienen la saliva y el líquido gingival, que pueden actuar como agentes de bloqueo inespecífico de las células bacterianas a las superficies del hospedador;
  - una vez que la célula bacteriana se une a la superficie del área subgingival, los anticuerpos específicos de dicha área podrían tornar a las bacterias susceptibles a diversos mecanismos de fagocitosis o

destrucción. Los leucocitos polimorfonucleares afectan a las especies bacterianas mediante fagocitosis o por liberación de sus enzimas lisosómicas en el surco o en la bolsa;

- cuando una especie bacteriana penetra en el tejido conjuntivo subyacente ha llegado a la zona en la que los mecanismos de defensa del hospedador son más poderosos. Los macrófagos y diversos tipos de linfocitos se unen a los leucocitos polimorfonucleares y anticuerpos.

Además, para que un patógeno periodontal cause enfermedad es esencial que sea capaz de producir factores que lesionen directamente el tejido del hospedador o que lleven al propio hospedador a lesionar sus tejidos (Socransky y Haffajee, 2009). Las sustancias microbianas que causan daño en los tejidos periodontales pueden englobar sustancias que dañan las células tisulares (como el sulfuro de hidrógeno), sustancias que determinan que las células liberen sustancias biológicamente activas (como los lipopolisacáridos) y sustancias que afecten a la matriz intercelular (como la colagenasa). Además, los factores que afectan a las células que intervienen en los mecanismos de defensa del hospedador pueden inhibir las respuestas protectoras o llevar a la producción de sustancias que lesionen directamente los tejidos. Así, por ejemplo, las enzimas producidas por especies subgingivales son capaces de degradar casi todas las macromoléculas halladas en los tejidos periodontales. El patógeno periodontal *P. gingivalis* es un claro ejemplo de ello, dado que produce una amplia gama de proteasas entre las que se incluyen las que degradan el colágeno, inmunoglobulinas y fibronectina.

El informe de consenso del “Workshop” Mundial de Periodoncia de 1996 concluyó que *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* eran patógenos periodontales con asociación calificada como fuerte como agentes etiológicos de las periodontitis. Además, cabe destacar el papel en la patogenia de las periodontitis de otros microorganismos como son diferentes especies de espiroquetas, *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *C. rectus* (Socransky y Haffajee, 2009).

## Enfermedades peri-implantarias

En las últimas décadas, el uso de implantes dentales como recurso para sustituir dientes naturales perdidos por caries, traumatismos o enfermedades periodontales, ha supuesto un gran adelanto en el tratamiento de pacientes edéntulos o parcialmente edéntulos. Sin embargo, estos implantes no están exentos de problemas a medio y largo plazo, destacando la aparición de enfermedades peri-implantarias (Berglundh y col., 2002). Las enfermedades peri-implantarias incluyen aquellos procesos inflamatorios en los tejidos que rodean un implante (Albrektsson e Isidor, 1994), y podemos distinguir: la mucositis peri-implantaria, que consiste en una inflamación reversible en los tejidos blandos que rodean un implante en funcionamiento; y la peri-implantitis en la que, además de inflamación, hay pérdida de hueso peri-implantario (Zitzmann y Berglundh, 2008).

Se postula que las enfermedades peri-implantarias tienen origen infeccioso y naturaleza inflamatoria y están causadas por bacterias presentes en las biopelículas orales, tanto sobre las superficies de los implantes como en los tejidos blandos peri-implantarios (Lang y Berglundh, 2011). Cuando se coloca un implante en la cavidad oral se proporciona una superficie nueva y diferente desde el punto de vista físico para la colonización de microorganismos. Al igual que ocurre sobre los dientes naturales, una vez que se expone el implante en la cavidad oral, se formará sobre la superficie del mismo una película adquirida. Esta película actuará como substrato para la colonización bacteriana, que ocurrirá en tan solo 30 minutos desde la exposición de la superficie implantaria; la biopelícula, a continuación, evolucionará hasta la madurez, siguiendo las directrices ya comentadas (Fürst y col., 2007).

Al igual que en el periodonto sano alrededor de un diente natural, los microorganismos asociados con implantes sanos son predominantemente cocos y bacilos Gram-positivos. Las especies dominantes son miembros del complejo amarillo y púrpura, además de miembros independientes como *A. naeslundii* o

*Actinomyces viscosus*. Las bacterias Gram-negativas estarán en menor proporción, representadas principalmente por miembros de los complejos naranja, rojo y verde (*P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. nicrescens* y *C. rectus*) (Quirynen y col., 2006; Fürst y col., 2007; Lee y Wang, 2010; Kumar y col., 2012; Do Nascimento y col., 2013). El adecuado sellado permucoso del tejido blando a la superficie del implante protege la base del surco contra la penetración de sustancias extrañas. Con la pérdida de este sellado inicial, la mucosa peri-implantaria podrá progresar desde la salud hasta la mucositis y, en algunos casos, a la peri-implantitis. En este momento, la microbiota alrededor del implante va cambiando, predominando ahora las bacterias Gram-negativas anaerobias. Los implantes fracasados se caracterizan por presentar una alta proporción de miembros del complejo rojo (*P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*) y del naranja (*P. intermedia* y *F. nucleatum*), así como *A. actinomycetemcomitans* y *E. corrodens*. De hecho, la principal diferencia entre salud y enfermedad se asocia a la mayor proporción de *Actinomyces*, y miembros del complejo rojo y naranja. Otros microorganismos como *S. aureus*, *Candida albicans* o enterobacterias han sido también asociados a la peri-implantitis (Quirynen y col., 2006; Shibli y col., 2008; Tabanella y col., 2009; Lee y Wang, 2010; Kumar y col., 2012).

Los tejidos peri-implantarios se comportarán de una manera muy similar a los periodontales frente a la agresión bacteriana, con la subsiguiente formación de una placa subgingival con todos los factores de virulencia, la respuesta del hospedador, etc (Lee y Wang, 2010; Lang y Berglundh, 2011).

### **3.2. REPERCUSIONES SISTÉMICAS DE LAS BIOPELÍCULAS ORALES**

Durante siglos, los médicos y los odontólogos creían que las bacterias que cubrían los dientes, esto es, la placa dental, y las consiguientes enfermedades infecciosas, como caries, gingivitis y periodontitis, eran focos de infección que conducían a una amplia variedad de alteraciones sistémicas (van Winkelhoff y Slots, 1999; O'Reilly y Claffey 2000). Ya en la antigua Grecia, Hipócrates informó de

la curación de un caso de artritis mediante la extracción de un diente (Baumgartner, 2008). En 1891, Willoughby Miller hizo hincapié en la posibilidad de que microorganismos orales diseminados a localizaciones no orales pudieran producir enfermedad, tales como otitis, osteomielitis, septicemia, piemia, trastornos del aparato digestivo, noma, difteria, tuberculosis, sífilis y muguet (O'Reilly y Claffey, 2000). Tras estas afirmaciones, las siguientes décadas fueron testigos de un temor a las infecciones focales de origen bucal, llegando a proponerse por parte de algunos clínicos, como el médico británico William Hunter, las intervenciones dentales drásticas (exodoncias) para evitar la sepsis inducida por vía oral. Surgió entonces, en 1911, el concepto de “infección focal oral”, que calificaba a ciertas bacterias presentes en la placa dental, o a sus toxinas, como factores de riesgo de varias afecciones sistémicas (Williams y Paquette, 2009). Sin embargo, durante las décadas que siguieron poco se tuvo en cuenta la posibilidad de infección focal oral, excepto para los pacientes con riesgo de sufrir quizá endocarditis infecciosa y tal vez para los individuos severamente inmunocomprometidos.

A pesar de los informes anecdóticos de mejora de las enfermedades no orales tras el seguimiento de un tratamiento dental o la extracción de un diente, el concepto de infección focal oral sigue siendo controvertido debido a la falta de pruebas irrefutables sobre el origen de la infección o del microorganismo, o bien de la toxina, que produce la enfermedad. En la actualidad, con el avance de técnicas aplicadas en microbiología, se ha demostrado que el hábitat que algunas de las bacterias orales es únicamente la cavidad oral, lo que ha abierto una nueva vía de investigación acerca de la infección focal oral, y es que la cavidad oral actuaría como el lugar de origen de la difusión de microorganismos patógenos a sitios distantes del cuerpo. Se han detectado bacterias orales, entre otras localizaciones, en placas ateroscleróticas, válvulas cardíacas o aneurismas aórticos, principalmente de las especies *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* y *P. gingivalis* (Pucar y col., 2007; Figuero y col., 2011).

La ciencia emergente propone a la periodontitis como posible factor de riesgo de varias afecciones sistémicas, a saber, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, enfermedades pulmonares y causas de efectos adversos sobre el embarazo (van Winkelhoff y Slots, 1999; Singh y col., 2000; Williams y Paquette, 2009; Parahitiyawa y col., 2009; Kerschull y col., 2010). Además, los tratamientos odontológicos y las actividades orales cotidianas pueden ser las causantes de una diseminación hematogena de bacterias periodontopatógenas. Numerosos trabajos científicos avalan la incidencia de bacteriemia después de procedimientos dentales, como extracciones, endodoncias, cirugías periodontales o raspado radicular (Li y col., 2000; Castillo y col., 2011). En las últimas guías publicadas por la Sociedad Británica de Antimicrobianos y quimioterapia (Gould y col., 2006), la Asociación Americana del Corazón (AHA) (Wilson y col., 2007), el Instituto Nacional para la Salud y Excelencia Clínica (NICE) del Reino Unido (Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica, 2008), y la Sociedad Europea de Cardiología (2009), se concede importancia a las bacteriemias post-tratamientos y las debidas a las actividades orales diarias, como el cepillado y la masticación.

Sin embargo, para que la hipótesis no caiga en descrédito por segunda vez, no deben hacerse atribuciones sin base de sustentación, ni teorías sin pruebas. La era actual de la medicina y la odontología basadas en la evidencia provee un excelente entorno en el cual examinar las posibles relaciones entre infecciones bucales y trastornos sistémicos (Mealey y Klokkevold, 2009).

Se han propuesto tres vías que vinculan las infecciones orales con infecciones secundarias no orales (Li y col., 2000):

- Infección metastásica: como se mencionó anteriormente, las infecciones orales y procedimientos dentales pueden causar bacteriemia transitoria, y es que generalmente los microorganismos que consiguen acceder al torrente sanguíneo son eliminados por el sistema reticuloendotelial en cuestión de minutos. Sin embargo, si los microorganismos encuentran

condiciones favorables, pueden alcanzar un órgano determinado, y después de un lapso de tiempo, incluso multiplicarse.

- Lesión metastásica: algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tienen la habilidad de producir proteínas difusibles, o exotoxinas, las cuales, cuando acceden al hospedador, desencadenan un gran número de manifestaciones patológicas.
- Inflamación metastásica: antígenos solubles pueden acceder al torrente sanguíneo, reaccionar con anticuerpos específicos y formar un inmunocomplejo que puede dar lugar a una variedad de reacciones inflamatorias agudas y crónicas en los sitios de deposición.

En la Tabla 2, adaptada de Li y col., 2000, se enumeran las posibles vías de infecciones orales y las enfermedades no orales relacionadas.

**Tabla 2.** Posibles vías de infecciones orales y las enfermedades no orales relacionadas.

Vía para la infección oral	Posible enfermedad no oral
Infección metastásica desde la cavidad oral vía bacteriemia transitoria	Endocarditis infecciosa subaguda y aguda, miocarditis bacteriana, absceso cerebral, trombosis del seno cavernoso, sinusitis, absceso/infección pulmonar, angina de Ludwig, celulitis orbitaria, úlceras en la piel, osteomielitis, infección de la articulación protésica
Lesión metastásica por la circulación de toxinas de microorganismos orales	Infarto cerebral, infarto agudo de miocardio, resultado anormal embarazo, pirexia persistente, neuralgia del trigémino idiopática, síndrome del shock tóxico, fallos en el sistema celular granulocítico, meningitis crónica
Inflamación metastásica causada por lesión inmunológica de microorganismos orales	Síndrome de Behcet, urticaria crónica, uveítis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn.

#### **4. CONSTRUYENDO UNA BIOPELÍCULA. MODELOS *IN VITRO* DE BIOPELÍCULA ORAL**

Como ya se ha comentado, el medio ambiente oral humano es un nicho complejo en el que los microorganismos de los tres dominios de la vida se encuentran formando biopelículas, y donde las bacterias constituyen el componente más abundante y diverso, con aproximadamente 1200 taxones bacterianos presentes. Pese a que numerosos estudios de investigación están aplicando y desarrollando nuevas técnicas de cultivo y de biología molecular como parte de un esfuerzo para describir el microbioma oral, todavía estamos en los escalones de entrada en términos de la comprensión del funcionamiento de estas comunidades microbianas organizadas en biopelícula. Por ende, la biopelícula oral, concretamente la placa dental, es el agente etiológico de algunas de las enfermedades más prevalentes del ser humano, como son las enfermedades periodontales y la caries, además de estar relacionado con enfermedades sistémicas. A todo esto se suma la resistencia de las bacterias en biopelícula a tratamientos antimicrobianos, que es casi 1000 veces superior que en estado planctónico.

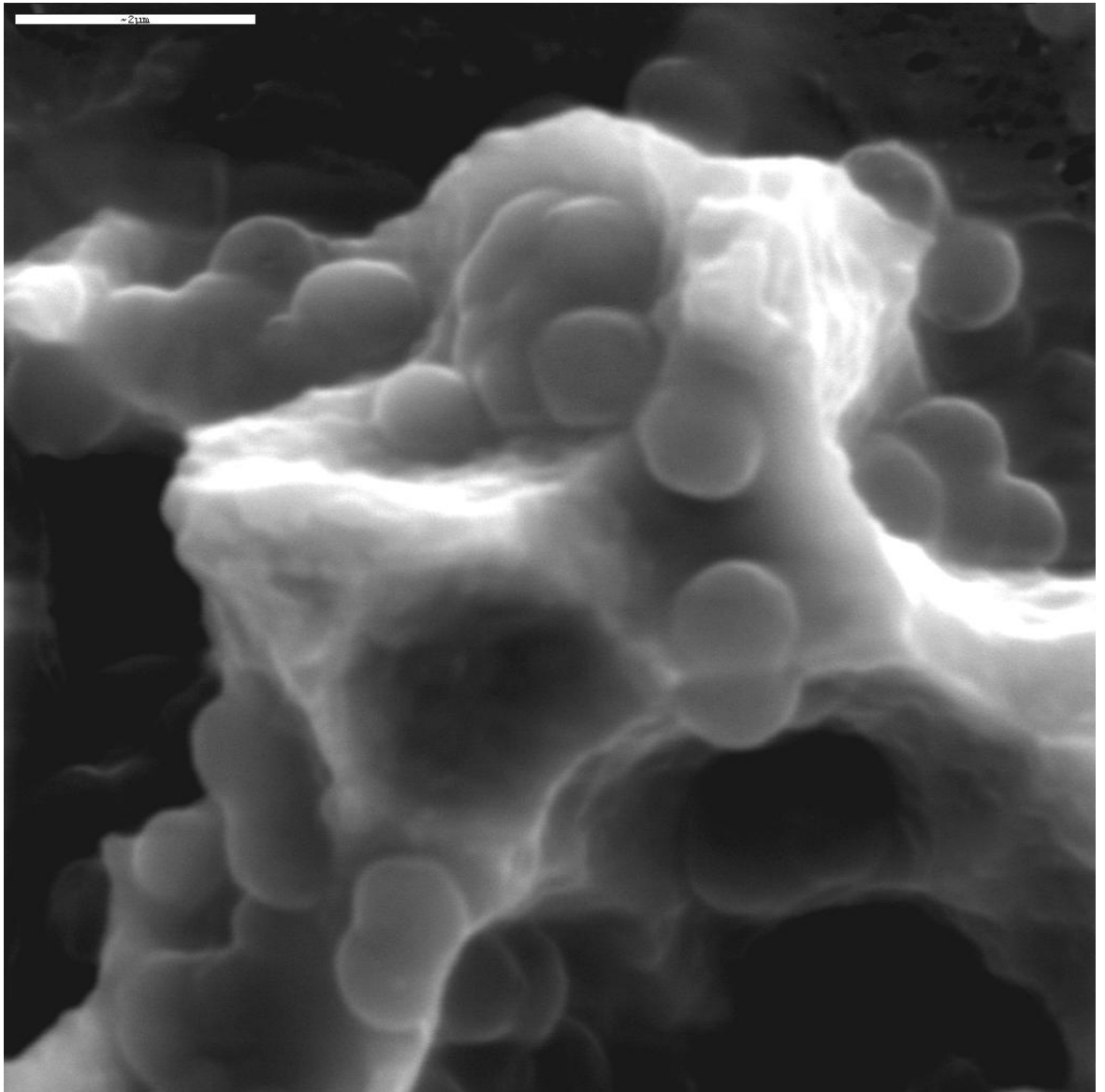
Está descrito en la literatura científica como diversos grupos de investigación han creado modelos que representen a la biopelícula oral, que faciliten el estudio en profundidad de su estructura, la dinámica de la comunidad microbiana que albergan, los determinantes ecológicos que marcan pautas en su formación y desarrollo, o su posible susceptibilidad o resistencia a agentes antibacterianos.

Con este fin se han aplicado distintas tecnologías, que combinan diferentes tipos de inóculos bacterianos de partida y mecanismos de generación. Entre los distintos tipos de inóculos bacterianos se han descrito férulas parciales que se insertan en pacientes, placa dental de pacientes como inóculo, o consorcios definidos de especies bacterianas. En cuanto a la dinámica del sistema, se han

propuesto modelos en modo estático, utilizando placas de cultivo, o en modo dinámico, basados en biogeneradores (Netuschil y col., 1998; Wecke y col., 2000; Pratten y col., 2000; Guggenheim y col., 2001; Auschill y col., 2001; Takeuchi y col., 2004, Eick y col., 2004; Foster y col., 2004; Kuramitsu y col., 2005; Hope y Wilson, 2006; Díaz y col., 2006; Walker y Sedlacek, 2007; Tamura y col., 2008; Periasamy y Kolenbrander, 2009; Dige y col., 2009; Amman y col., 2012). Sin embargo, son pocos los modelos multiespecies descritos hasta el momento que reproduzcan las condiciones ambientales de la placa dental, dado que la mayoría no tienen una distribución de especies representativas.



# JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## **1. JUSTIFICACIÓN**

Es necesario estudiar el comportamiento de las bacterias orales en biopelícula para poder establecer estrategias terapéuticas adecuadas a las enfermedades derivadas de su acción. Teniendo en cuenta que resulta muy difícil la investigación de las biopelículas orales *in vivo*, así como conseguir un modelo de placa oral reproducible desde placa recogida de pacientes, y que son pocos los modelos multiespecies disponibles que reproduzcan las condiciones ambientales de la placa dental, consideramos de interés desarrollar un modelo de biopelícula oral *in vitro*, sencillo de manejar y reproducible, en el que se incluyan las principales bacterias periodontopatógenas, y que nos permita estudiar, mediante la puesta a punto de técnicas metodológicas basadas en biología molecular, la dinámica de la comunidad microbiana que alberga, los determinantes ecológicos que marcan pautas en su formación y desarrollo, o su posible susceptibilidad o resistencia a agentes antibacterianos.

## **2. HIPÓTESIS**

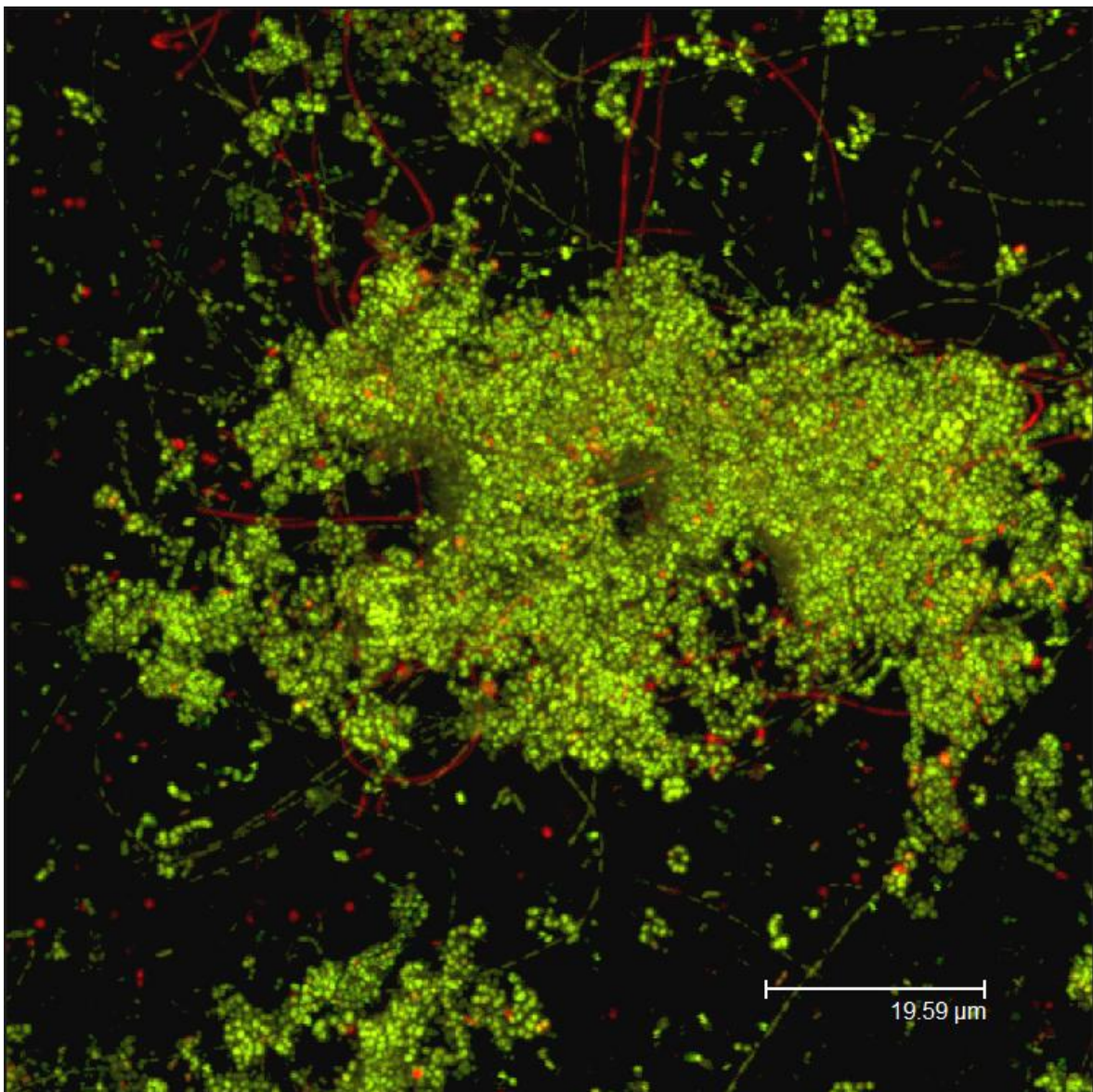
Partiendo de las directrices que describen *in vivo* la formación y desarrollo de la placa dental, se va a desarrollar un modelo *in vitro* de biopelícula oral, que sea reproducible y sencillo de manejar, inoculando bacterias representativas de la placa dental en un medio ambiente físico-químico similar a las condiciones ambientales de la cavidad oral. El modelo permitirá mejorar el conocimiento de estas comunidades y evaluar su posible susceptibilidad o resistencia a agentes antibacterianos, sin los problemas éticos que supone trabajar con pacientes.

## **3. OBJETIVOS**

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Desarrollar y validar un modelo experimental de biopelícula oral *in vitro*, que sea reproducible y sencillo de manejar, que simule la composición de la microbiota subgingival, y que permita estudiar tanto su estructura como su evolución a lo largo de todas sus fases de desarrollo, desde los primeros pasos de colonización hasta la madurez.
2. Evaluar la posibilidad de usar la técnica de bioluminiscencia procedente de la molécula adenosin trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés) para una valoración cuantitativa de la vitalidad bacteriana en el modelo de biopelícula oral, y compararlo con el método de cultivo estándar, para testar la resistencia de las bacterias incluidas en la biopelícula frente a agente antibacterianos.
3. Evaluar la utilidad de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en la modalidad cuantitativa a tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) combinada con monoazida de propidio (PMA, por sus siglas en inglés) para el análisis de la vitalidad de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en estado planctónico.
4. Evaluar la eficacia de la técnica combinada de qPCR y PMA en el modelo *in vitro* de biopelícula oral para analizar la vitalidad de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y bacterias totales en estado de biopelícula, tras la exposición a un agente antibacteriano.

# MATERIALES Y MÉTODOS. RESULTADOS





Los materiales y métodos, al igual que los resultados de las investigaciones realizadas en la presente tesis, han sido publicados como artículos científicos originales en cuatro publicaciones independientes en las revistas científicas *Journal of Periodontal Research* y *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* con las siguientes referencias:

1. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research* 2011; 46:252-260.
2. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Marín MJ, Figuero E, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an *in vitro* subgingival-biofilm model. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2013; 18:e86-92.
3. Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, Herrera D, Sanz M. Analysis of viable versus dead *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* using selective quantitative real-time PCR with propidium monoazide. *Journal of Periodontal Research* 2013; 48: 213–220.
4. Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an *in vitro* subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research* 2013; doi: 10.1111/jre.12073.



## 1. ESTUDIO 1

Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research* 2011; 46:252-260.

### RESUMEN

**Antecedentes y objetivo:** hay muy pocos modelos *in vitro* descritos en la literatura científica que permitan estudiar la estructura, formación y evolución de una biopelícula subgingival. El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un modelo de biopelícula *in vitro*, seleccionando bacterias representativas de la microbiota subgingival.

**Material y Método:** se utilizaron seis bacterias de referencia para generar la biopelícula sobre discos cerámicos estériles de hidroxiapatita cálcica (HA), cubiertos con saliva, en placas multipocillo de cultivo celular. Las bacterias seleccionadas representan colonizadores primarios (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*). La estructura de la biopelícula se analizó usando una técnica vital de fluorescencia combinada con microscopía laser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés). La cinética bacteriana de la biopelícula se estudió mediante el análisis del polimorfismo en la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP, por sus siglas en inglés).

**Resultados:** después de 12 h, los primeros microorganismos detectados en la superficie de los discos de HA fueron los colonizadores primarios y tempranos. El colonizador secundario *F. nucleatum* no fue detectado en el modelo hasta pasadas 24 h de incubación. Los colonizadores tardíos *P. gingivalis* y *A.*

*actinomycescomitans* pudieron ser detectados en la biopelícula después de 48 h de incubación. La biopelícula alcanza la madurez entre las 72 y 96 h de inoculación, con un incremento de la vitalidad bacteriana desde la superficie del disco de HA hacia la parte central de la biopelícula.

**Conclusión:** el estudio ha permitido el desarrollo y validación de un modelo de biopelícula oral *in vitro*, demostrando un patrón de colonización bacteriana y maduración similar al desarrollo *in vivo* de la biopelícula subgingival.

# Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota

M. C. Sánchez<sup>1</sup>, A. Llama-Palacios<sup>1</sup>, V. Blanc<sup>2</sup>, R. León<sup>2</sup>, D. Herrera<sup>1</sup>, M. Sanz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ETEP Research Group, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain and <sup>2</sup>Dentaid SA, Barcelona, Spain

Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodont Res* 2011; 46: 252–260. © 2011 John Wiley & Sons A/S

**Background and Objective:** There are few *in vitro* models available in the scientific literature for study of the structure, formation and development of the subgingival biofilm. The purpose of this study was to develop and validate an *in vitro* biofilm model, using representative selected bacteria from the subgingival microbiota.

**Material and Methods:** Six standard reference strains were used to develop biofilms over sterile ceramic calcium hydroxyapatite discs coated with saliva within the wells of presterilized polystyrene tissue culture plates. The selected species represent initial (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*), early (*Veillonella parvula*), secondary (*Fusobacterium nucleatum*) and late colonizers (*Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). The structure of the biofilm obtained was studied using a vital fluorescence technique in conjunction with confocal laser scanning microscopy. The biofilm bacterial kinetics were studied by terminal restriction fragment length polymorphism analysis.

**Results:** After 12 h, initial and early colonizers were the first microorganisms detected adhering to the calcium hydroxyapatite discs. The intermediate colonizer *F. nucleatum* was not detected in the model until 24 h of incubation. Late colonizers *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* could be measured inside the biofilm after 48 h. The biofilm reached its steady state between 72 and 96 h after inoculation, with bacterial vitality increasing from the hydroxyapatite surface to the central part of the biofilm.

**Conclusion:** An *in vitro* biofilm model was developed and validated, demonstrating a pattern of bacterial colonization and maturation similar to the *in vivo* development of the subgingival biofilm.

Dr Mariano Sanz, MD, DDS, DrMed, Section of Periodontology, Faculty of Odontology, Plaza Ramón y Cajal s/n – Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain  
Tel: +34 913941901  
Fax: +34 913941910  
e-mail: marianosanz@odon.ucm.es

**Key words:** subgingival plaque; anaerobic biofilm; confocal laser scanning microscopy; terminal restriction fragment length polymorphism

Accepted for publication November 25, 2010

The human oral cavity is a complex ecological environment where microorganisms, bathed in a liquid medium (saliva), have access to both hard and

soft tissue surfaces to adhere, hence to develop biofilms. Human dental plaque is a dynamic and complex biofilm where bacteria from saliva are adhered

to tooth surfaces, embedded in a matrix of polymers. The development and maturation of dental plaque as a biofilm has profound implications in

the etiology and progression of the most prevalent infections affecting humans, namely, dental caries and periodontal diseases (1).

Numerous studies have attempted to describe the bacterial composition of dental plaque in both healthy and diseased subjects, reporting the presence of hundreds of microbial species organized in communities (2–4). The number of bacterial species is currently undetermined and becomes increasingly higher as advances in molecular techniques allow for more specific identification profiles (5–9). Dental plaque usually develops at stagnant sites between teeth (approximal surfaces), in the pits and fissures on the occlusal surfaces of molars and premolars or at the tooth–gingival interface (gingival crevice). Dental plaque in approximal surfaces as well as in pits and fissures usually evolves into a cariogenic microbiota, with high proportions of streptococci and lactobacilli species. At the tooth–gingival interface, in periodontal health, gram-positive bacteria dominate the composition of the supragingival plaque, with high proportions of streptococci species. As gingival inflammation develops (gingivitis), this microbiota evolves to a more complex composition, with increasing proportions of gram-negative, anaerobic bacteria species. When the periodontal lesion (periodontal pocket) is established, there is a clear predominance of high proportions of gram-negative anaerobic species, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces* spp., *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* (2–4,10).

The composition of these oral biofilms has been studied using different bacterial identification methods, but there is, however, a lack of adequate knowledge of its structure, community dynamics and ecological determinants. This is probably due to the inherent heterogeneity and structural complexity of these biofilms and to the difficulties of studying *in vivo* dental plaque in health and disease. In order to overcome some of these difficulties, simplified *in vitro* models have been developed with the objective of studying the most salient features of these bacterial communities (11). With the

purpose of mimicking the supragingival plaque biofilm, several investigators have developed specific-species biofilm models, using either microtitre plates or flow cell assays (12–14), by constructing oral devices (splints) carried by subjects that allow plaque accumulation (15–18), or by using a constant-depth film fermenter once dental plaque is inoculated (11,19,20).

There are, however, few models available in the scientific literature for study of the structure, formation and development of subgingival plaque. Some attempts have been made by placing inserts of different materials into periodontal pockets of periodontitis patients (21,22), or by using dispersed subgingival plaque or a selection of specific subgingival bacteria, in microtitre plate assays or in the constant-depth film fermenter systems (14,20,23–25). Very few of these studies, however, have provided accurate information on how subgingival plaque matures over time and the sequence of events that occurs in the development of a steady-state biofilm. The purpose of this study was, therefore, to develop and validate an *in vitro* biofilm model aiming to simulate the composition of the subgingival microbiota, comprising initial (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*), early (*Veillonella parvula*), secondary (*Fusobacterium nucleatum*) and late colonizers (*P. gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Moreover, we attempted to study its structure and dynamics using both morphological (confocal laser scanning microscopy; CLSM) and molecular approaches (terminal restriction fragment length polymorphism; T-RFLP).

## Material and methods

### Bacterial strains

Standard reference strains of *S. oralis* CECT 907T, *V. parvula* NCTC 11810, *A. naeslundii* ATCC 19039, *F. nucleatum* DSMZ 20482, *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 8324 and *P. gingivalis* ATCC 33277 were used in this study. Bacteria were grown on blood agar plates (blood agar oxoid no. 2; Oxoid, Basingstoke, UK), supplemented with

5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/mL hemin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 1.0 mg/mL menadione (Merck, Darmstadt, Germany) in anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and balance N<sub>2</sub>) at 37°C for 24–72 h.

### Growth kinetics of standard reference strains

Each of the six standard reference strains was grown in modified brain–heart infusion medium by anaerobic incubation at 37°C for 24–72 h. This protein-rich medium contains brain–heart infusion (Becton, Dickinson and Company; Becton, Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 2.5 g/L mucin (Oxoid), 1.0 g/L yeast extract (Oxoid), 0.1 g/L cysteine (Sigma), 2.0 g/L sodium bicarbonate (Merck), 5.0 mg/mL hemin (Sigma), 1.0 mg/mL menadione (Merck) and 0.25% (v/v) glutamic acid (Sigma). The growth kinetics were evaluated by generating growth curves of each experiment in triplicate. After incubation, the bacteria were harvested in the late exponential growth phase and added to fresh modified brain–heart infusion medium in order to begin the growth curve at the lag phase [0.05 of optical density (OD) at 550 nm]. At specified time intervals, measurements of the OD at 550 nm were made and 100 µL aliquots taken. These aliquots were diluted serially in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2; 0.1 M), plated in duplicate on supplemented blood agar plates, and incubated in anaerobic conditions at 37°C for 4–7 d. After incubation, the counts of the total number of colony-forming units (CFU) per millilitre of sample were calculated.

### Preparation of saliva

Whole and unstimulated saliva samples collected in sterile plastic tubes were obtained from healthy volunteers at least 1.5 h after eating, drinking or tooth brushing. Aliquots of 10.0 mL were treated with 2.5 mM DL-dithiothreitol (Sigma) for 10 min with stirring to reduce salivary protein aggregation. Treated saliva was then centrifuged (10 min, 4°C, 30,000 g)

and the supernatant was diluted 50% with PBS, filtered, sterilized through a 0.22 µm pore size Millex GV low-protein-binding filter ×50 (Millipore; Millipore Corp., Bedford, MA, USA) and stored at -20°C. The efficacy of this protocol was assessed by plating processed saliva samples onto supplemented blood agar plates, incubating for 72 h at 37°C and observing no growth on either aerobically or anaerobically incubated plates.

#### Biofilm development assays

The six standard reference strains selected were used to develop biofilms over sterile ceramic calcium hydroxyapatite discs (HA), 7 mm in diameter and 1.8 mm thick (SD 0.2 mm; Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, USA), within the wells of presterilized polystyrene, 24-well tissue culture plates (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany). The bacterial concentration was adjusted by spectrophotometry in order to obtain a solution in modified brain-heart infusion medium containing 10<sup>3</sup> CFU/mL for *S. oralis*, 10<sup>5</sup> CFU/mL for *V. parvula* and *A. naeslundii*, and 10<sup>6</sup> CFU/mL for *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. The HA discs were coated with 50% sterile saliva for 4 h at 37°C in sterile plastic tubes and then placed in the wells of a 24-well tissue culture plate. Each well was then filled with 1.5 mL pooled bacterial culture prepared and incubated in anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and balance N<sub>2</sub>) at 37°C for up to 7 d (1, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 or 168 h), with a change to fresh medium at 48 h intervals after 72 h of incubation. The plates employed for assessing the sterility of the culture medium were used as controls.

#### Confocal laser scanning microscopy analysis of biofilms and statistical analysis

Before the CLSM analysis, the discs were sequentially rinsed in 2 mL of sterile PBS (immersion time per rinse, 10 s) three times, in order to remove nonadherent bacteria.

Noninvasive confocal imaging of fully hydrated biofilms was carried out by means of a fixed-stage TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) incorporating a 488 nm Ar/Ar-Kr laser scan head mounted on a vibration-free platform. The objective lenses used were ×10 dry and ×63 water-immersion lenses (Leica Microsystems). Specimens were stained with LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight™ Bacterial Viability kit solution (Molecular Probes BV, Leiden, The Netherlands) at room temperature. The 1:1 ratio of fluorochromes and 9 ± 1 min of staining time were used to obtain the optimal fluorescence signal at the corresponding wavelengths (SYTO9<sup>®</sup>, 515–530 nm; Propidium Iodide, > 600 nm). At least three separate and representative locations on the HA discs covered with biofilm, which contained stacks (or 'towers') that could be isolated within the confocal view field, were selected for these measurements. Within each area, the thickest point was measured by determination of the upper and lower boundaries of the biofilm. The CLSM control software was set to take a z-series of scans (xyz) of 0.5 µm thickness (8 bits, 1024 × 1024 pixels). Image stacks were analysed by using the LEICA CONFOCAL LITE<sup>®</sup> software (Leica Microsystems). In order to quantify the biomass and cell viability within the biofilm, total fluorescence staining of the confocal micrographs was analysed using the image analysis program METAMORPH<sup>®</sup> 7.6 software (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA). The program was used to calculate the percentage of the biomass and cell viability from stacks of two-channel images by measuring voxel intensities. Fluorescence intensity thresholds were manually set for each of the fluorescence colours. The resulting biofilm contents were analysed for statistical significance.

SPSS version 13.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for all data analyses. The Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate the normality of the distribution, by measuring the skewness and kurtosis for each variable. The data for all variables were expressed as means and SD. Statistical significance was established at the 95% confidence level.

#### Extraction of DNA

Before DNA extraction, the discs were sequentially rinsed in 2 mL of sterile PBS (immersion time per rinse, 10 s) three times, in order to remove non-adherent bacteria.

The biofilm samples were then collected in sterile plastic tubes that contained 1.0 mL of PBS, and were separated from the HA disc by vortexing for 3 min. The DNA was extracted from the bacterial cell pellet obtained using the DNA extraction kit GNome DNA Kit<sup>®</sup> (MP Biomedicals, LLC, Cleveland, OH, USA) following the manufacturer's instructions. Bulk nucleic acids were precipitated from solution with ethanol followed by centrifugation. The DNA precipitate was washed with 70% ethanol, dried, and resuspended in 50 µL of sterile water. The bacterial genomic DNAs used as controls were extracted from pure cultures following the same protocol. Genomic DNA was stored at -20°C until analysis.

#### PCR amplification of the 16S rDNA

The primers used for the PCR amplification of 16S rRNA gene sequence were 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1544R (5'-AGA-AAGGAGGTGATCCAGCC-3').

Forward primer 27F was labeled at the 5' end with the 6'-carboxyfluorescein (6-FAM), which was synthesized by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Amplification reactions were carried out in triplicate, performed in a total volume of 50 µL containing template DNA (100 ng), 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 µM of each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen). The 16S rRNA genes were amplified in an Applied Biosystems Thermocycler model 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) using the following program: 94°C for 3 min, followed by 35 cycles consisting of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min and 72°C for 3 min, with a final extension cycle of 72°C for 10 min. Amplified 16S rDNA was verified by electrophoresis on a 1.0% agarose gel, in 1× TAE

buffer. To remove primers and to concentrate amplicons, the Illustra Kit® (GE Healthcare, Chalfont St.Giles, Bucks UK) was used according to the manufacturer's protocol. Purified 16S rDNAs were stored at -20°C until analysis.

#### Terminal restriction fragment length polymorphism analysis

The restriction enzymes were selected according to Moyer *et al.* (26). To assess the reproducibility of T-RFLP analysis, three different PCRs from a single DNA sample were performed and combined. Purified PCR product (15 µL) was digested with 30 units (1.5 U/µL) of either *RsaI* or *MspI* (Roche Diagnostics, Meylan, France) in a total volume of 20 µL at 37°C for 4 h. The restriction digest product (1 µL) was mixed with 13.75 µL of de-ionized formamide and 1 µL DNA fragment-length standard. The standard size marker was GS 500 LIZ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), including 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 350, 400, 450, 490 and 500 bp. Each sample was denatured at 95°C for 5 min and then immediately placed on ice for 5 min. The length of the terminal restriction fragment (T-RF) was determined on a 3730 DNA analyser (Applied Biosystems) at 15 kV, 8 mA and 60°C for

40 min for each sample. Fragment sizes were estimated by using the PEAK SCANNER software version 1.0 (Applied Biosystems). As the excised mixture of amplicons was analysed in a DNA sequencer, only the terminal fragments were read. The resulting T-RFLP profile was expressed in an electropherogram representing the total fluorescence as a peak instead of the band in the electrophoresis gel. The abundance of each T-RF was determined based on fluorescence intensity and expressed as peak height. Terminal restriction fragments with a peak height of <400 fluorescence units were excluded from the analysis.

Predicted T-RFLP patterns for the 16S rDNAs of each of the bacterial species used in the study were obtained from pure cultures by enzyme digestion with *RsaI* or *MspI*.

## Results

### Bacterial growth kinetics

Comparisons of the OD obtained at 550 nm with direct counts showed that an OD of 1.0 corresponded to a direct count of  $1.0 \times 10^9$  cells/mL for *S. oralis*, reaching the stationary phase in 4 h;  $1.5 \times 10^9$  cells/mL for *A. naeslundii*, reaching the stationary phase in 22 h;  $3.6 \times 10^{10}$  cells/mL for *V. parvula*, reaching the stationary phase in

42 h;  $6.0 \times 10^8$  cells/mL for *F. nucleatum*, reaching the stationary phase in 24 h;  $1.8 \times 10^9$  cells/mL for *A. actinomycetemcomitans*, reaching the stationary phase in 30 h; and  $4.0 \times 10^9$  cells/mL for *P. gingivalis*, reaching the stationary phase in 49 h. These results ensured similar initial conditions for the *in vitro* biofilm assay.

### Structural analysis of the biofilm and viability assessment

Biofilms were collected at different times (1, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 or 168 h) and analysed by CLSM. To confirm the repeatability of the biofilm-generating procedure, three independent trials (on three different occasions) with trios of biofilms were carried out. Figure 1 shows representative confocal micrographs depicting two-dimensional maximum projection images of the biofilms per time point. Viability of the biofilms was analysed using CLSM images stained with LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability kit solution (Molecular Probes), clearly delineating the viable and nonviable bacteria as green- and red-stained cells, respectively. Table 1 shows the evolution of the biofilm thickness and vitality.

One hour after inoculation, some multicellular aggregates, probably originating from the inoculum, could

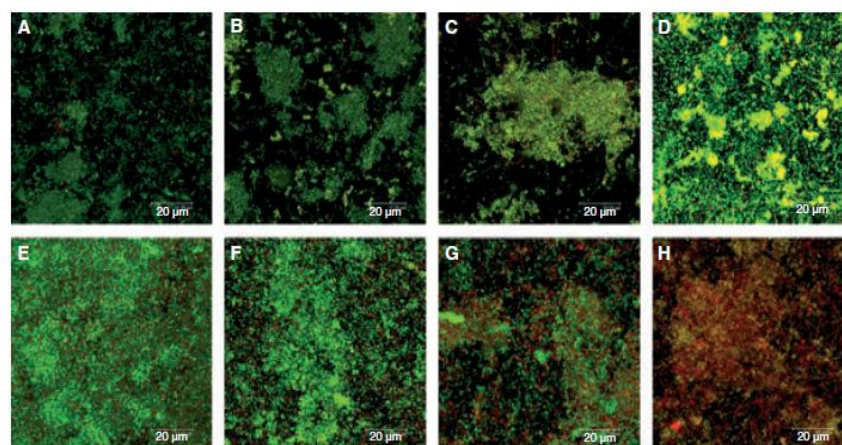


Fig. 1. Confocal micrographs representing a two-dimensional maximum projection of the series along a fixed axis of the biofilms after 12 h (A), 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D), 96 h (E), 120 h (F), 144 h (G) and 168 h (H) of growth. BacLight Live/Dead stain was used to assess the vitality of cells.

Table 1. Observed changes in biofilm vitality and thickness

Biofilm sample	12 h (n = 9)	24 h (n = 9)	48 h (n = 9)	72 h (n = 9)	96 h (n = 9)	120 h (n = 9)	144 h (n = 9)	168 h (n = 9)
Vitality (%)								
Mean	78.4	80.7	78.2	60.7	57.7	54.5	46.2	23.7
Standard deviation	9.1	9.9	13.5	9.5	17.1	10.6	11.3	8.4
Median	78.2	79.4	80.9	58.1	56.6	55.5	40.9	24.1
Interquartile range	9.5	7.3	17.3	13.4	12.0	21.4	14.5	9.3
Thickness (µm)								
Mean	29.6	30.7	25.8	35.1	35.5	25.6	21.1	21.2
Standard deviation	5.7	12.4	11.0	16.9	11.9	12.6	4.3	5.2
Median	27.4	25.6	24.2	36.0	37.9	22.4	20.0	20.0
Interquartile range	9.0	10.5	16.8	10.0	21.0	3.9	2.1	2.0

be seen sparsely attached to the HA surface. After 12 h of *in situ* formation, biofilms consisted mostly of a large cell population arranged either as single cells or as short streptococcal chains, attached to the saliva-coated HA surface. Some stacks could be identified, mostly comprised of viable bacteria, with 78.4% (SD 9.1%) of viable cells and a measurable mean thickness of 29.6 µm (SD 5.7 µm). After 24 h of incubation, bacterial cells were distributed in clusters of microcolonies and were arranged in larger stacks (mean height of 30.7 µm; SD 12.4 µm) against a background of single cells attached to the saliva-coated HA discs; 80.7% (SD 9.9%) of the bacterial population was alive. At this moment, spindle-shaped rods, indicating *F. nucleatum*, were observed inside the biofilm. After 48 h, the biofilm appeared firmly attached to the saliva-coated surface of the HA disc. The biomass was doubled, with a cell viability of 78.2% (SD 13.5%), and the biofilm developed into a multilayered consortium of bacteria, with the formation of stacks reaching up to 36 µm. The biofilm continued to develop for 72 h with an increased biomass but with decreased cell vitality, with values close to 60.7% (SD 9.5%). The entire disc surface was covered with cells, combining a continuous layer of cells with clusters forming prominences. Between 96 and 144 h of incubation, no relevant changes occurred in the biofilm structure, suggesting that the biofilm had reached a steady state. The height of the biofilm reached up to 38 µm, but vitality continued to decline, with values between 46.2%

(SD 11.3%) and 57.7% (SD 17.1%). After 168 h of incubation, biofilm biomass and cell vitality decreased dramatically, with only 23.7% (SD 8.4%) of cells alive.

The cell viability profiles were also assessed throughout the depth of the biofilm, along the *z*-axis. The 72-h-old biofilms (steady state) showed an increase of the cell viability percentage with depth. In the bottom half of the biofilm, however, the profiles of viability tended to fall with increasing depth. In this biofilm model, therefore, a lower percentage of vital organisms was found near the HA disc surface, while the percentage increased in the *z*-axis towards the central parts. Along the *x/y*-axis, no general pattern for vitality distribution could be identified.

Using 72-h-old biofilms (steady state), the reproducibility of this biofilm model was assessed, based on the evaluation of the biomass and cell vitality within the biofilm. The statis-

tical analysis showed that there was a homogeneous distribution of vitality among the samples ( $p = 0.959$ ). Steady-state biofilms presented a mean vitality of 60.7% (SD 9.5%) and median of 58.1% with an interquartile range of 13.4%.

#### Single organism terminal restriction fragments

In order to identify individual organisms by their T-RFLP pattern within the *in vitro* biofilm, T-RF lengths were determined for all organisms used (Fig. 2). For each bacterium, the observed T-RF lengths were different by a maximum of 4 bp within three trials after digestion with *RsaI* and *MspI* (Table 2), and an extra T-RF was observed for some organisms (Fig. 2), possibly indicating 16S rDNA sequence heterogeneity in these organisms. Digestion with *MspI* resulted in similar length T-RFs for two different organisms (Table 2).

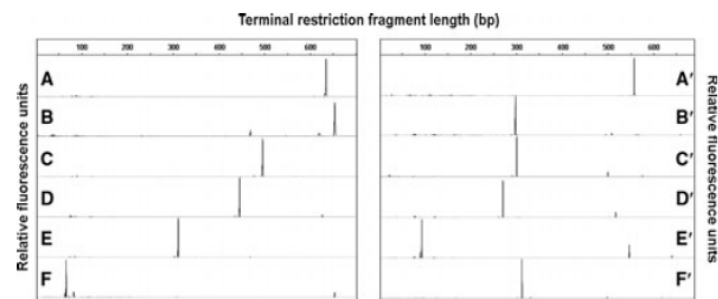


Fig. 2. Terminal restriction fragment length polymorphism patterns derived from *RsaI* and *MspI* digestion, respectively, of 16S rDNAs from the following individual bacteria used: *S. oralis* (A–A'), *A. naestlundii* (B–B'), *V. parvula* (C–C'), *F. nucleatum* (D–D'), *P. gingivalis* (E–E') and *A. actinomycetemcomitans* (F–F').

Table 2. Observed length of terminal restriction fragments (T-RFs) of 16S rDNA amplified from the six individual bacteria used

Bacterial strain	Length (bp) of the 5' T-RFs after digestion with	
	<i>RsaI</i>	<i>MspI</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	631 ± 1	556 ± 1
<i>Veillonella parvula</i>	495 ± 1	299 ± 1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	650 ± 4	297 ± 3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	440 ± 1	267 ± 1
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	314 ± 1	93 ± 1
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	70 ± 1	307 ± 1

**Bacterial community T-RFLPs from in vitro biofilm samples**

Universal primers 6-FAM-27F and 1544R were used to amplify 16S rRNA genes of oral bacteria within the generated biofilms. The T-RFLP patterns were derived from the *RsaI* and *MspI* digestion of amplified 16S rDNAs. Each T-RFLP profile consisted of the ratio between the number of fragments with unique lengths and the relative abundance of each fragment, as reflected by the size of each peak in the electropherogram, where the x-axis depicts the fragment size and the y-axis the fragment fluorescence intensity.

Each peak corresponds to one genetic variant in the biofilm, while its height corresponds to its relative abundance in the biofilm.

Figure 3 shows one of the three sets of T-RFLP profiles per biofilm, selected arbitrarily, from 12 to 168 h of incubation from the *RsaI* digestion. Visual inspection of the T-RFLP patterns in Fig. 3 provides confirmation of the differences between the bacterial communities sampled at different times of incubation. The proportion of the bacterial species integrating into the biofilm increased gradually between 12 and 48 h of incubation. Within the first 1–12 h of

incubation, biofilms demonstrated three different T-RFs that corresponded to the T-RFLP pattern of the initial and early colonizers *S. oralis* (632 ± 1 bp), *A. naeslundii* (650 ± 4 bp) and *V. parvula* (495 ± 1 bp; Table 2). These results are consistent with the observed CLSM patterns at this incubation time, where the biomass was represented either by single cells or short streptococcal chains. After 24 h, a new T-RF emerged, with a size of 440 ± 1 bp, corresponding to *F. nucleatum*. At the same time, the peak heights (relative fluorescence units) of *S. oralis*, *A. naeslundii* and *V. parvula* T-RFs increased, indicating higher numbers of each bacterial population, although *A. naeslundii* showed a slower growth rate compared with *S. oralis* and *V. parvula*. These results are consistent with the significant increase of biomass measured by CLSM at this incubation time. After 48 h of *in situ* formation, two new T-RFs could be identified at 70 ± 1 and 315 ± 1 bp, corresponding to *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, respectively. Therefore, after 48 h of incubation, the six bacterial species inoculated were part of the biofilm. Between 48 and 96 h, biofilms demonstrated similar T-RFLP patterns, with an increase in peak heights, indicating an increase in the bacterial population, thus demonstrating the maturation of the biofilm, also in conformity with the CLSM results. After 120 h of incubation, the peak heights of T-RFs tended to diminish progressively and were clearly reduced after 168 h. The results obtained by digestion with *MspI* were in agreement with the generated T-RFLP patterns after digestion with *RsaI* (data not shown).

Dynamic profiles for each biofilm species resulting from averaging three independent experiments are shown in Fig. 4A. These profiles are based on the T-RFLP analysis after digestion with *RsaI*. Figure 4B shows the relative proportion of each species from 1 to 168 h biofilm samples, obtained from the T-RFLP patterns after *RsaI* digestion of 16S rDNAs. These proportions were generated by dividing the relative fluorescence per species by the total relative fluorescence of the

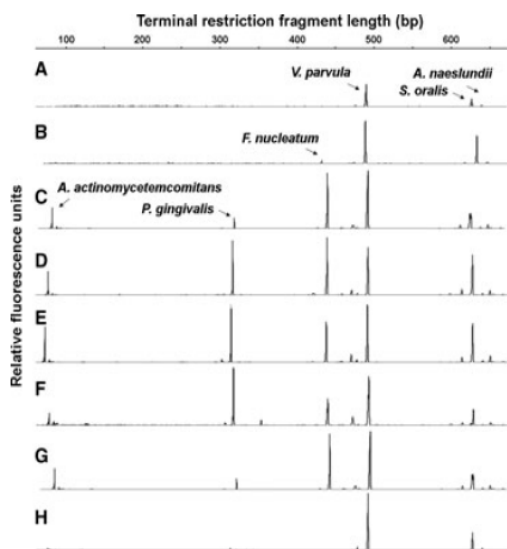


Fig. 3. Terminal restriction fragment length polymorphism patterns derived from *RsaI* digestion of 16S rDNAs from biofilm samples after the following incubation times: 12 h (A), 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D), 96 h (E), 120 h (F), 144 h (G) and 168 h (H). Arrows indicate fluorescence peaks corresponding to each terminal restriction fragment present in the biofilm bacteria, *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*.

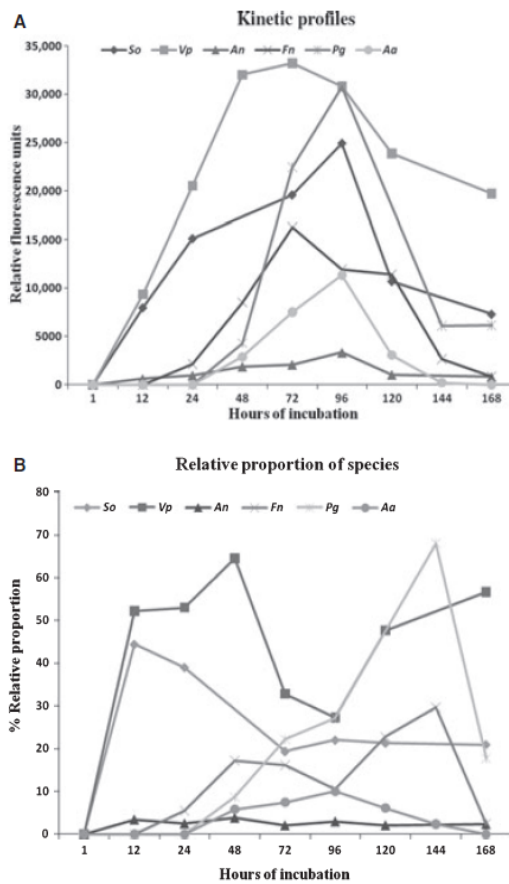


Fig. 4. (A) Kinetic profiles of the six standard strains in the biofilm, obtained from terminal restriction fragment length polymorphism patterns derived from *RsaI* digestion of 16S rDNAs from biofilm samples from 1 to 168 h. (B) Kinetic profiles of the relative bacterial proportions within the biofilm obtained from the terminal restriction fragment length polymorphism patterns after *RsaI* digestion of 16S rDNAs. *S. oralis* (So), *V. parvula* (Vp), *A. naeslundii* (An), *F. nucleatum* (Fn), *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg).

sample. This total fluorescence is an indication of the total DNA quantity represented by each profile and was calculated in each sample from the sum of all peak heights  $\geq 400$  fluorescence units (400 fluorescence units being the threshold for baseline noise).

**Discussion**

In this investigation, we have attempted to develop an *in vitro* biofilm model using well-defined species simulating the composition of the *in vivo* subgingival plaque. The selected species are frequently found in the subgingival plaque (2,4,5,8) and include initial, early, intermediate and late colonizers,

belonging to different clusters or complexes, as described by Socransky *et al.* (27). Among them, relevant periodontal pathogens are included, such as *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. This six selected bacterial species also exemplify a wide range of metabolic and physiological characteristics, which represent a diverse array of oral bacteria (13).

Very few subgingival biofilm models have been reported in the literature, probably due to the inherent difficulties in obtaining reproducible growth of these microorganisms. The growth medium is one of the key factors in *in vitro* biofilm development, because it strongly influences intra- and interspe-

cies aggregation and co-aggregation (12). In this biofilm model, we developed a complex medium with a high proportion of proteins, reproducing the carbon and energy sources available to bacteria within the oral cavity. With the use of this medium, together with the inoculated six selected bacterial species on natural saliva-coated HA discs in anaerobic conditions, we were able to develop a biofilm. The experimental conditions in this model also included a discontinuous flow system in the cell culture plates, with the aim of minimizing detachment forces and avoiding liquid-air interfaces during the renewal of fresh culture medium (12). This flow system only dislodged a loose halo of bacteria on the surface of the biofilm, but not the cells attached to the disc surface. These experimental conditions have the advantage over other systems, such as the constant-depth film fermenter or flow cell assays, which utilize fluid flows or scraper blades that generate continuous detachment forces, with the risk of modifying the biofilm structure (11,14,20).

The structure and spatial distribution of viable and nonviable bacteria in the generated biofilm was evaluated using CLSM in conjunction with fluorescence staining. This is a noninvasive and nondestructive microscopic technique, frequently used in studies assessing the biofilm structure, from dental plaque biofilm models generated in mouth splints worn by healthy volunteers, from *in vitro* models using dispersed plaque bacteria, or from constant-depth film fermenter models using a defined multispecies inoculum (15,16,18–20). All these studies have reported different structural descriptions, but in general there is agreement with the results reported in this investigation that generated biofilms show an uneven spatial distribution of vital and dead microorganisms. In the present biofilm model, the viability profiles showed that in steady-state biofilms (72-h-old biofilms), the percentage of vital microorganisms was lower adjacent to the HA disc surface, but increased in the *z*-axis towards the central parts, which contained a greater percentage of viable bacteria.

There were higher proportions of viable bacteria in the upper layers of the biofilm compared with the deeper layers. This may be due to the scarcity of essential nutrients and/or physicochemical conditions (e.g. pH, redox potential) in the deeper biofilm layers, which results in dead or physiologically inactive cells showing lower fluorescence intensity (11). The bacteria in the deeper layers of the biofilm are likely to be dependent on one or more metabolic end-products derived from the organisms located at the center of the stacks, hence dying from deprivation of these essential nutrients. This dead biological material is probably an important factor in the initial phase of dental biofilm development, because bacteria in the intermediate layer may benefit from its close proximity to dead cells in the basal layer and use this cellular material in the basal layer as a source of nutrients (15). This finding of dead bacterial layers adjacent to the HA disc surface has been previously described in histochemical and electron-microscopic studies (16).

The initial attachment of bacteria to a hard surface in a liquid-phase medium is essential to the biofilm formation. Even though the six selected bacterial species were simultaneously exposed to a substratum, the sequence of their incorporation into the biofilm model shown in this investigation confirmed the pattern that occurs in subgingival plaque formation *in vivo* (28). Although the research on the composition of bacterial communities within biofilms has used different identification methods, the advent of molecular biological techniques has provided a more comprehensive, rapid and precise bacterial characterization than the first attempts using conventional culture-dependent methods (4,7-9,14,23,29,30). In the present report, the bacterial dynamics inside the biofilm were described by determining T-RFLP of genes encoding 16S rRNA. The analysis of T-RFLP has been demonstrated to be a well-suited molecular approach for studying complex bacterial communities, because the differences in the sizes of T-RFs reflect differences in the sequences of 16S rRNA genes (i.e. sequence poly-

morphisms), thus detecting phylogenetically distinct populations of organisms and providing a rapid and reproducible description of the bacterial population dynamics (31-33). Determination of the length of fluorescently labeled T-RFs by automated DNA sequencers allowed a highly precise fragment length determination, using internal size standards in every profile, and provided numerical data of high resolution. The ability of this method to differentiate microbial communities has been previously validated (29,30,34).

In this investigation, the T-RFLP analysis resulted in the initial colonization by *S. oralis* and *A. naeslundii* that appeared attached to the HA disc after 12 h, probably by adhering directly to the acquired pellicle. Also as an early colonizer, *V. parvula* was identified at 12 h of incubation. The intermediate colonizer found was *F. nucleatum*, which was not detected in this model until 24 h of incubation. Late colonizers included *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, which were identified within the biofilm after 48 h of *in situ* formation. Biofilms showed an increase in the bacterial population between 72 and 96 h after inoculation, reaching the steady state at this time. After 96 h, the peak heights decreased as the biofilm aged. In these old biofilms, the presence of dead bacteria, as confirmed by CLSM, would result in DNA degradation and therefore in altered T-RF peak heights.

This biofilm behavior is in agreement with other studies analysing biofilm communities of subgingival plaque either *in vivo* (21,22) or *in vitro*, using dispersed subgingival plaque (20,24), as well as those models using selected bacterial consortia (14,23,25). Periasamy & Kolenbrander (14) demonstrated that *P. gingivalis* could not grow as a single species or together with the initial colonizer *S. oralis*, but showed a positive growth when inoculated with other bacterial species, such as *Veillonella* spp. (early colonizer), *F. nucleatum* (secondary colonizer) and *A. actinomycetemcomitans* (late colonizer). We were able to demonstrate in the present model that six bacterial

species grew in consortia and developed into a well-defined biofilm structure.

In conclusion, an *in vitro* biofilm model has been developed and validated, using defined multibacterial species from the subgingival plaque, which included initial (*S. oralis* and *A. naeslundii*), early (*V. parvula*), secondary (*F. nucleatum*) and late colonizers (*P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*). The combined use of confocal laser scanning microscopy and terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA demonstrated the usefulness of these techniques for studying the spatial distribution and dynamics of specific members of the bacterial communities in a biofilm model. This model was reproducible, and as it is technically simple to prepare, maintain and analyse, it is very suitable for studying the development, structure and dynamics of the subgingival biofilm, as well as for undertaking comparative studies to test different antimicrobial approaches.

#### Acknowledgements

This study was funded through a CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) Research Project with the Ministry of Science and Innovation and the company DENT-AID, SA. We thank for their technical assistance Luis M. Alonso and Alfonso Cortés from the Centre of Microscopy and Cytometry from the University Complutense, Madrid and M. I. García Sáez from the Genomics Unit at the UCM-Parque Científico.

#### References

1. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 2010;**89**:8-18.
2. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;**27**:648-657.
3. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:5721-5732.
4. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the

- human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006;**42**:80–87.
5. Smith GL, Socransky SS, Sansone C. "Reverse" DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1989;**4**:141–145.
  6. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C *et al.* Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004;**19**:352–362.
  7. Rasiah IA, Wong L, Anderson SA, Sissons CH. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Arch Oral Biol* 2005;**50**:779–787.
  8. Ledder RG, Gilbert P, Huws SA *et al.* Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:516–523.
  9. Keijser BJ, Zaura E, Huse S *et al.* Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008;**87**:1016–1020.
  10. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:644–654.
  11. Wimpenny J. Laboratory models of biofilm. In: Heman HN, Wilson N, eds. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*. Cardiff, UK: Bioline, 1999:89–110.
  12. Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001;**80**:363–370.
  13. Foster JS, Kolenbrander PE. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol* 2004;**70**:4340–4348.
  14. Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 2009;**191**:6804–6811.
  15. Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 1998;**43**:277–285.
  16. Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001;**46**:471–476.
  17. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH *et al.* Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006;**72**:2837–2848.
  18. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology* 2009;**155**:2116–2126.
  19. Pratten J, Andrews CS, Craig DQ, Wilson M. Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2000;**189**:215–218.
  20. Hope CK, Wilson M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods* 2006;**66**:390–398.
  21. Wecke J, Kersten T, Madela K *et al.* A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 2000;**191**:95–101.
  22. Takeuchi H, Yamanaka Y, Yamamoto K. Morphological analysis of subgingival biofilm formation on synthetic carbonate apatite inserted into human periodontal pockets. *Aust Dent J* 2004;**49**:72–77.
  23. Kuramitsu HK, Chen W, Ikegami A. Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2005;**76**:2047–2051.
  24. Walker C, Sedlacek MJ. An *in vitro* biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2007;**22**:152–161.
  25. Tamura A, Ara T, Imamura Y, Fujii T, Wang PL. The effects of antibiotics on *in vitro* biofilm model of periodontal disease. *Eur J Med Res* 2008;**13**:439–445.
  26. Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl Environ Microbiol* 1996;**62**:2501–2507.
  27. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;**25**:134–144.
  28. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;**66**:486–505.
  29. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J Med Microbiol* 2003;**52**:79–89.
  30. Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J Med Microbiol* 2004;**53**:563–571.
  31. Clement BG, Kehl LE, DeBord KL, Kitts CL. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J Microbiol Methods* 1998;**31**:135–142.
  32. Kitts CL. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2001;**2**:17–25.
  33. Schutte UM, Abdo Z, Bent SJ *et al.* Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;**80**:365–380.
  34. Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 2001;**67**:190–197.



## 2. ESTUDIO 2

**Sánchez MC, Llama-Palacios A, Marín MJ, Figuero E, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an *in vitro* subgingival-biofilm model. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2013; 18:e86-92.**

### RESUMEN

**Objetivo:** el propósito de este trabajo de investigación ha sido evaluar si el método basado en la bioluminiscencia procedente de la molécula adenosin trifosfato (ATP) es una herramienta útil para estudiar la eficacia de colutorios antisépticos frente a bacterias orales en biopelícula en términos de la reducción del número de bacterias totales viables en la biopelícula *in vitro*.

**Diseño del estudio:** tres colutorios, que contenían, respectivamente, clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio (CHX/CPC), aceites esenciales (EO) y fluoruro de amina/fluoruro de estaño (AFSF), así como un buffer fosfato salino (PBS) usado como control, fueron testados en un modelo estático de biopelícula *in vitro* mediante la técnica de ATP-bioluminiscencia, y los resultados fueron comparados con los obtenidos por la técnica de cultivo. Las biopelículas se desarrollaron sobre discos cerámicos estériles de hidroxiapatita cálcica (HA), cubiertos con saliva, durante 72 h y después se expusieron durante 1 minuto a los colutorios y a la solución control por inmersión. El efecto antibacteriano de los colutorios se testó mediante el análisis de la varianza. La validez del método ATP-bioluminiscencia fue estudiado calculando los coeficientes de correlación de Pearson, cuando se compararon los resultados obtenidos por esta técnica con los obtenidos por la técnica de cultivo.

**Resultados:** usando la técnica de ATP-bioluminiscencia, la actividad antimicrobiana de los colutorios testados ha sido demostrada, comparando con el control. Los valores obtenidos por ATP-bioluminiscencia presentan una correlación estadísticamente significativa (0,769;  $p < 0,001$ ) con los que se obtuvieron del recuento de las células viables por cultivo. Los colutorios con CHX/CPC y AFSF presentaron una actividad antimicrobiana similar, aunque AFSF tuvo un efecto menos homogéneo, siendo ambos más efectivos que el colutorio con EO.

**Conclusión:** la técnica de ATP-bioluminiscencia puede ser considerada una herramienta útil para testar *in vitro* la eficacia de compuestos antibacterianos. En el modelo propuesto de biopelícula multiespecie, los colutorios con CHX/CPC y AFSF presentaron una actividad antimicrobiana superior cuando se comparan con el colutorio que contenía EO.

## Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an *in vitro* subgingival-biofilm model

María-Carmen Sánchez <sup>1</sup>, Arancha Llama-Palacios <sup>1</sup>, María-José Marín <sup>1</sup>, Elena Figuero <sup>1</sup>, Rubén León <sup>2</sup>, Vanessa Blanc <sup>2</sup>, David Herrera <sup>1</sup>, Mariano Sanz <sup>1</sup>

<sup>1</sup> ETEP (Aetiology and Therapeutics of Periodontal Diseases) Research Group, University Complutense of Madrid, Spain

<sup>2</sup> Dentaïd SA, Barcelona, Spain

Correspondence:  
Faculty of Odontology  
Plaza Ramón y Cajal s/n  
Ciudad Universitaria  
28040 Madrid, Spain  
marianosanz@odon.ucm.es

Sánchez MC, Llama-Palacios A, Marín MJ, Figuero E, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an *in vitro* subgingival-biofilm model. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013 Jan 1;18 (1):e86-92.  
http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v18i1/medoralv18i1p86.pdf

Received: 30/03/2012  
Accepted: 07/06/2012

Article Number: 18376 <http://www.medicinaoral.com/>  
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - pISSN 1698-4447 - eISSN: 1698-6946  
eMail: [medicina@medicinaoral.com](mailto:medicina@medicinaoral.com)  
Indexed in:  
Science Citation Index Expanded  
Journal Citation Reports  
Index Medicus, MEDLINE, PubMed  
Scopus, Embase and Emcare  
Indice Médico Español

### Abstract

**Objectives.** The aim of this investigation was to evaluate whether the adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence method is an appropriate tool to assess the efficacy of antiseptic mouthrinses in terms of quantitative reductions of total viable microbial counts in mixed biofilm populations *in vitro*.

**Study Design.** Three mouthrinses, containing respectively, chlorhexidine and cetylpyridinium chloride (CHX/CPC), essential oils (EO) and amine fluoride/stannous fluoride (AFSF), as well as Phosphate Buffered Saline (PBS) used as control, were tested in an *in vitro* static biofilm model by ATP bioluminescence and compared to culture method. Biofilms were grown on saliva-coated hydroxyapatite disks for 72 hours and then exposed for 1 minute to the mouthrinse or control by immersion. The antibacterial effect of the rinses was tested by analysis of variance. The reliability of the ATP bioluminescence method was assessed by calculating the Pearson correlation coefficients when compared to the viable cell counts obtained by culture.

**Results.** Using ATP bioluminescence, the antimicrobial activity of the tested mouthrinses was demonstrated when compared to the PBS control. The ATP bioluminescence values were significantly correlated (0.769,  $p < 0.001$ ) to the viable cell counts. CHX/CPC and AFSF showed similar antimicrobial activity, although AFSF had a less homogeneous effect, being both more effective than the EO rinse.

**Conclusion.** ATP bioluminescence viability testing may be considered a useful tool to assess the *in vitro* efficacy of antibacterial compounds. In the proposed model, CHX/CPC and AFSF containing mouthrinses demonstrated superior antimicrobial activity, as compared to EO rinses, in a multispecies biofilm model.

**Key words:** Biofilm, ATP bioluminescence, mouthrinse, essential oils, chlorhexidine, amine fluoride/stannous fluoride.

## Introduction

The effective control of the dental plaque is the key in the prevention of periodontal diseases. Several studies have demonstrated that the mechanical removal of the supragingival plaque through effective oral hygiene practices prevents or reverses the inflammatory status of the gingival tissues (1-3). Epidemiological data indicates, however, that most individuals do not control plaque accumulation to a sufficient extent to prevent or control the occurrence of this condition, probably due to lack of motivation or skills, or both (3,4). In order to overcome this hindrance, antimicrobial oral hygiene products have been investigated in their efficacy to additionally reduce plaque and gingivitis when used daily as adjuncts to mechanical plaque control. Since human dental plaque is a dynamic and complex biofilm where bacteria from saliva are adhered to tooth surfaces embedded in a matrix of extracellular polymers (5), the efficacy of these antimicrobials must be tested within these environments rather than in planktonic status, due that bacteria in matured biofilms are less susceptible to antimicrobial agents because of several physical and biological factors that protect the bacterial consortia (6-8).

Several studies have attempted to study the effect of mouthrinses in biofilms *in vitro* (8-12). Traditionally, bacterial counts on agar plates was the method of choice for determination of bacterial viability, although this method has clear limitations, as the relatively long times needed for the colony growth, the differences in the growth media used or the likely growth inhibition by neighbouring cells (13). The use of morphological methods, as Confocal Laser Microscopy (CLSM), are useful to assess the structure and physiology of biofilms, but it does not allow the assessment of changes in the bacterial viability when biofilms are exposed to antiseptic compounds (11). Also, culture-independent molecular methods for identification and quantification of oral bacteria have been extensively developed during recent years, but they are still not widely used in routine laboratories, due to the relatively long persistence of DNA after cell death, in the range between days to 3 weeks, what may overestimate the number of live cells after an antiseptic treatment (14). One possible alternative is the adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence method, which has been utilized as a quantitative assay to evaluate viable bacteria in different biological samples, as well as in dental plaque (15-19). This method is based on the activity of the nucleotide ATP as a key element in the energy exchange of all biological systems. ATP serves as the principal immediate donor of energy and it is present in all metabolically active cells, since it links catabolic and anabolic processes. When cells are lysed, the released ATP can be measured by bioluminescence through its reaction with the luciferin-luciferase. This reaction is

catalyzed by the enzyme luciferase obtained from the firefly *Photinus pyralis* that uses the chemical energy contained in the ATP molecule to drive the oxidative decarboxylation of luciferin. The MgATP<sup>2-</sup> converts the luciferin into a form, which is capable of being catalytically oxidized by the luciferase in a high quantum yield chemiluminescent reaction at 562 nm (19). The main advantage of this technique is the provision of a rapid and real-time quantification of viable bacteria, however this method has not been previously utilized to test the antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinses in an *in vitro* complex oral biofilm model.

There are few published *in vitro* biofilm models using a consortium of anaerobic bacteria where antimicrobial compounds can be adequately tested. Our research group has recently developed and tested such an *in vitro* biofilm model reporting its structure, viability and bacterial kinetics (20). This model uses six bacteria from the subgingival biofilm, containing initial (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*), early (*Veillonella parvula*), secondary (*Fusobacterium nucleatum*), and late colonizers (*Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*).

It is, therefore, the main purpose of this investigation evaluate the possibility to use ATP bioluminescence method for rapid quantitative evaluation of viable total oral bacteria in biofilms samples, as compared to standard culture methods, to test the bactericidal efficacy of antiseptic mouthrinses. For this purpose, we used three commercially available antiseptic mouthrinses containing respectively, chlorhexidine digluconate (CHX) and cetyl-pyridinium chloride (CPC), essential oils (EO), and amine fluoride/stannous fluoride (AMSF) in a tested and validated *in vitro* biofilm model (20).

## Material and Methods

### -Bacterial strains and culture conditions

Standard reference strains of *S. oralis* CECT 907T, *V. parvula* NCTC 11810, *A. naeslundii* ATCC 19039, *F. nucleatum* DMSZ 20482, *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 8324 and *P. gingivalis* ATCC 33277 were used. Bacteria were grown on blood agar plates (Blood Agar Oxoid No 2; Oxoid, Basingstoke, UK), supplemented with 5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/mL hemin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1.0 mg/mL menadione (Merck, Darmstadt, Germany) in anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, and balance N<sub>2</sub>) at 37°C for 24-72 h.

### -Saliva Preparation

Un-stimulated saliva was obtained from healthy volunteers in 10 ml aliquots at least 1.5 h after eating, drinking or tooth brushing. Saliva preparation were carried out as previously described (20). The efficacy of this

protocol was assessed by plating processed saliva samples onto supplemented blood agar plates for 72 h at 37°C and confirmed by the lack of any bacterial growth on either aerobically or anaerobically incubated plates.

#### -Biofilm development assays

Biofilms were developed as previously described (20). In brief, pure cultures were grown anaerobically in a protein rich medium containing brain-heart infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Company, USA) supplemented with 2.5 g/L mucin (Oxoid), 1.0 g/L yeast extract (Oxoid), 0.1 g/L cysteine (Sigma), 2.0 g/L sodium bicarbonate (Merck), 5.0 mg/mL hemin (Sigma), 1.0 mg/mL menadione (Merck) and 0.25% (v/v) glutamic acid (Sigma). The bacterial growth was adjusted by spectrophotometry to mid-exponential phase with the objective to obtain a solution in modified BHI medium containing 10<sup>3</sup> colony forming units (CFU)/mL for *S. oralis*, 10<sup>5</sup> CFU/mL for *K. parvula* and *A. naeshlundii*, and 10<sup>6</sup> CFU/mL for *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. Sterile calcium hydroxy-apatite disks of 7 mm of diameter and 1.8 (SD=0.2) mm of thickness (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, USA) were coated with treated saliva for 4 h at 37°C in sterile plastic tubes, and then placed in the wells of a 24-well tissue culture plate (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany). Each well was inoculated with 1.5 mL pooled bacteria culture prepared and incubated in anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, and balance N<sub>2</sub>) at 37°C for 72 h. The plates employed for assessing the sterility of the culture medium were used as controls.

#### -Tested mouthrinses

The following commercially available mouthrinses were evaluated: Perioaid treatment® (Dentaaid, Cerdanyola, Spain) containing 0.12% CHX and 0.05% CPC as active ingredients, without alcohol (CHX/CPC); Listerine® (Johnson & Johnson, Madrid, Spain) containing a combination of four essential oils (EO) as active ingredients (thymol 0.06%, eucalyptol 0.09%, methyl salicylate 0.06%, menthol 0.01%) in an alcoholic solution; and Meridol® (GABA GmbH, Lörrach, Switzerland), containing amine fluoride/stannous fluoride (AFSF) without alcohol. PBS and absolute ethanol (EtOH) served as the negative and positive controls, respectively.

#### -Exposure to oral rinses

To evaluate the bactericidal action of CHX/CPC, EO and AFSF wells containing 2 mL of suspension of the tested products, EtOH and PBS were prepared and once the 72-h biofilms were formed over HA discs they were transferred to the wells. Following a single 1 min-exposure, discs were sequentially washed three times in 2 mL of fresh PBS (immersion time per rinse, 10 s).

In each experiment, the three mouthrinses and the control solutions were tested together. The experiments were repeated nine times, on different days and with fresh bacterial cultures.

#### -Cell viability assessed by ATP bioluminescence

Immediately after treatment, each HA disc was transferred to sterile plastic tubes containing 1.0 mL of PBS, and vortexed vigorously for 2 min, to harvest adherent cells. The BacTiter-Glo viability assay kit® (Promega, Madison, WI, USA) was utilized to assess the ATP bioluminescence, following the manufacturer's instructions. This assay is based on the luciferase-catalysed reaction of luciferin and ATP and thus it quantifies the ATP present signalling the presence of metabolically active cells. In brief, 400 µL of BacTiter-Glo reagent was added with gentle stirring to a plastic cuvette containing 400 µL of disaggregated biofilm cells and incubated in darkness for 5 min at room temperature. The luminescent signal was recorded for 1 s per cuvette into a 1250 Luminometer (LKB-Wallac, Turku, Finland). The light output and ATP measurements were done at room temperature and expressed in Relative Light Units (RLUs) per mL. The culture medium and PBS, in the absence of cells, served as negative controls since they contained no detectable ATP.

#### -Cell viability assessed by culture methods

Using the same biofilms (as described in the previous section), standard microbiologic culture methods were carried out and the number of obtained colonies was compared with the ATP bioluminescence results. In brief, the disaggregated biofilms were subjected to 10-fold serial dilutions in PBS and then plated onto blood agar plates (Blood Agar Oxoid No 2), supplemented with 5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/mL hemin (Sigma) and 1.0 mg/mL menadione (Merck) in anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, and balance N<sub>2</sub>) at 37°C. All plating procedures were conducted in duplicate, and the number of colonies (between 30 and 300) were used to calculate the number of viable bacteria from a particular dilution and averaged to determine mean values colony forming units (CFU/mL).

#### -Statistical analysis

Data were calculated as RLU/mL, for samples analyzed by ATP bioluminescence, and as CFU/mL, for samples analyzed by culture-method. The proportions of vital cells after mouthrinse contact, as compared to the negative control, were calculated for both techniques. The vitality ratio was calculated by dividing the vitality value for each mouthrinse to the one given by the negative control.

An experiment-level analysis was performed for each study parameter (n=9). Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit tests were computed for each variable. Data were expressed as means and standard deviations (SD). Box-plots were used for the graphic presentation of data. To test the effect of each mouthrinse on cell vitality, analysis of variance (ANOVA) and post hoc-testing with Bonferroni's correction for multiple comparisons were used for both techniques (mean viable cell count

as CFU/mL, and the ATP-driven bioluminescence determinations, as RLU/mL). To determine the reliability of ATP-driven bioluminescence to measure cell vitality, Pearson correlation coefficient was determined between the ratio of vitality obtained by culture and ATP-driven bioluminescence. In addition, the existence of differences between ratios of vitality obtained by each technique was assessed by the Student t-test for independent samples.

Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . A software package (IBM® SPSS® Statistics 19.0) was used for all data analysis.

**Results**

**-ATP-driven bioluminescence**

All tested mouthrinses reduced the amounts of ATP-driven bioluminescence, as compared to the negative control solution. Statistically significant differences in bioluminescence were observed for CHX/CPC (mean difference 217.08 RLU/mL, 95% confidence interval -CI- [87.84, 346.32];  $p < 0.001$ ) and AFSF treatment (243.69, CI [114.45, 372.93];  $p < 0.001$ ) when compared to the negative control. No statistically significant changes in bioluminescence were found for EO when compared to the negative control (119.79, CI [-9.45, 249.04];  $p = 0.088$ ). No statistically significant differences were

found when the mouthrinses were compared. (Fig. 1) presents the comparative effect of CHX/CPC, EO and AFSF mouthrinses on the cell viability of biofilms assessed by ATP bioluminescence (RLU/mL). The lowest values were found for AFSF (233.08; SD=83.13), followed by CHX/CPC (259.69; SD=78.29), EO (356.98; SD=63.01) and the negative control (476.78; SD=53.25). AFSF, however, demonstrated the largest variability in the response.

**-Culture-dependent method**

Figure 2 depicts the effect of the tested mouthrinses over the biofilms, as assessed by viable cell counts obtained by standard culturing (CFU/mL). The lowest cell viability values were found for CHX/CPC ( $1.38 \times 10^8$  CFU/mL; SD= $8.54 \times 10^7$ ), followed by AFSF ( $1.42 \times 10^8$ ; SD= $9.03 \times 10^7$ ), EO ( $1.67 \times 10^8$ ; SD= $1.17 \times 10^8$ ) and the negative control ( $2.55 \times 10^8$ ; SD= $1.63 \times 10^8$ ). All groups presented large interquartile-range variability, being the largest deviations from the obtained median values shown by AFSF and EO. No statistically significant differences in viability cell counts were observed among mouthrinses or between each mouthrinse and the negative control.

**-Comparison between ATP-driven bioluminescence and culture-dependent method**

Table 1 shows the comparisons between obtained ratios of vitality by ATP bioluminescence and by culture. A

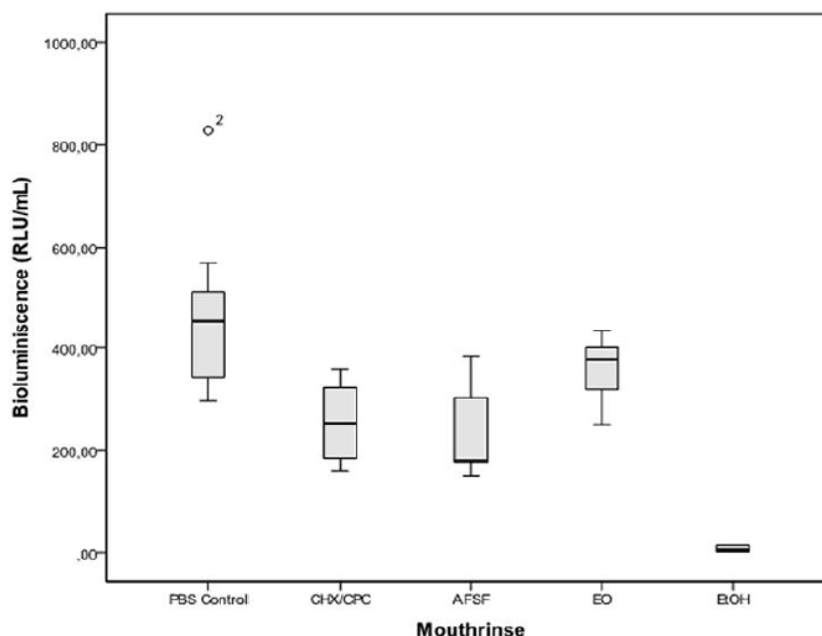


Fig. 1. Box plots showing ATP bioluminescence values from *in vitro* subgingival biofilms after treatment with the mouthrinses containing chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride (CHX/CPC), amine fluoride/stannous fluoride (AFSF) and essential oils (EO) compared to a negative PBS control and a positive EtOH control (n = 9). Differences between control and CHX/CPC and AFSF treatments were statistically significant ( $p < 0.005$ ). Differences between treatments were not significant. (RLU: Relative Light Units).

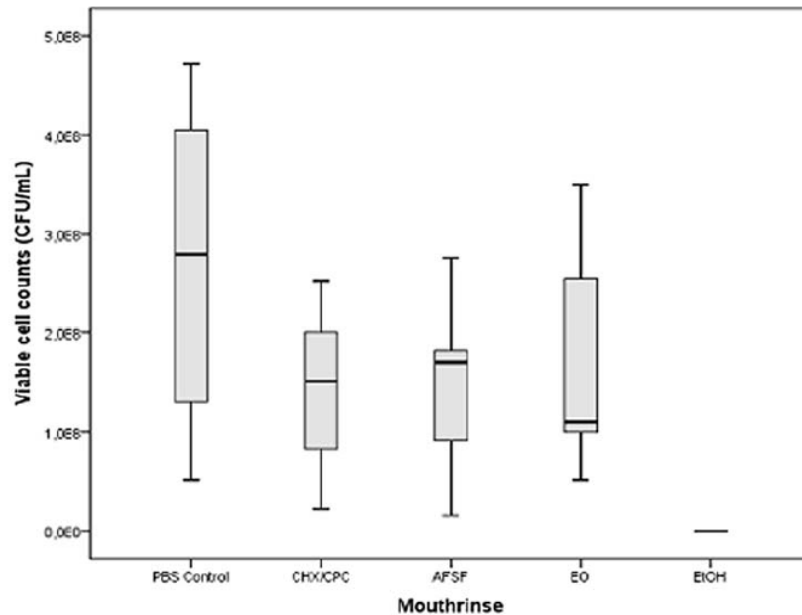


Fig. 2. Box plots showing viable cell count as Colony-Forming Units per mL values from *in vitro* subgingival biofilms after treatment with the mouthrinses containing chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride (CHX/CPC), amine fluoride/stannous fluoride (AFSF) and essential oils (EO) compared to a negative PBS control and a positive EtOH control (n = 9). Differences between control and all treatments were not significant. Differences among treatments were not significant.

Table 1. Ratios of vitality obtained with each mouthrinse by ATP-Bioluminescence and viable cell count.

Group	Technique	Ratio of vitality (mean)	Standard deviation	p value
CHX/CPC/Control	ATP-Bioluminescence	0.59	0.27	p=0.700
	Viable cell count	0.56	0.14	
AFSF /Control	ATP-Bioluminescence	0.52	0.20	p=0.696
	Viable cell count	0.56	0.13	
EO/control	ATP-Bioluminescence	0.81	0.26	p=0.551
	Viable cell count	0.73	0.25	

CHX/CPC, chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride; AFSF, amine fluoride/stannous fluoride; EO, essential oils. Student t-test for independent samples.

statistically significant correlation was observed ( $r=0.769$ ,  $p<0.001$ ) between both techniques. No statistically significant differences were found between the ratios of vitality for each mouthwash, when calculated by either technique.

Discussion

The objective of this study was to validate the use of the ATP bioluminescence method for rapid quantitative evaluation of viable total oral bacteria in biofilm samples after exposure to the antimicrobial agents. The obtained results have shown that the ATP biolu-

minescence method was capable of quantifying bacterial vitality, when applied to a validated *in vitro* biofilm model. In fact the relative antimicrobial effect of three tested antimicrobial compounds was demonstrated with this method when compared with a negative control and these results were similar when compared with standard culturing techniques.

The exposure of a relatively mature biofilm to a 1-min contact with the tested antimicrobials resulted in a bactericidal effect, demonstrating a significant reduction in the viable microbial load when compared to the negative control. EO

was substantially less effective than CHX/CPC and AFSF, which depicted similar antimicrobial activity, although AFSF demonstrated a higher variability in its antimicrobial effect. CHX/CPC, therefore, demonstrated the most efficacious activity in this *in vitro* biofilm model. These results are in agreement with the reported significant antimicrobial effect of a CHX formulation, as compared to a control, when evaluated by ATP bioluminescence in *P. gingivalis* biofilms (21), as well as with those reported in other studies using different biofilm models (9,10,11,22). All these experiments reported that the CHX-containing mouthrinses had significantly higher bactericidal activity than EO- and AFSF-containing formulations. Multiple long-term home-use randomized clinical trials have also demonstrated that CHX-based products are the most effective against plaque and gingivitis, with demonstrated antiplaque and antigingivitis effect (23). In addition, CHX-formulations have demonstrated better clinical results when compared to EO- and AFSF-formulations (24,25). The microbiological assay used in this study was the ATP bioluminescence technique. This method has previously shown valid to provide a real-time estimation of total viable bacteria in biological sample (19), although not tested before with a biofilm containing subgingival bacteria. Prior studies have shown a correlation between ATP measurements and the viable bacterial number obtained by standard culturing techniques (17,26,27) for the determination of total oral bacteria. The data from this investigation also showed a statistically significant correlation (Pearson correlation coefficient of 0.769,  $p < 0.001$ ) between both techniques. In addition, no statistically significant differences between the relative proportions of cell vitality values for each mouthwash calculated with both techniques were observed. These results confirm, therefore, the ability of this ATP technology as a suitable method to evaluate bacterial viability in an oral biofilm model, since the luminescent signal generated during cell lyses was proportional to the amount of ATP present. This technique has also being recently applied in other oral investigations, such as: the study of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms grown on titanium implants (16), the detection of cariogenic bacteria genes by a combination of allele-specific polymerase chain reactions and a novel bioluminescent pyrophosphate assay (15) and in a randomized clinical study of plaque retention by self-ligating versus elastomeric orthodontic brackets (17). In conclusion, the results of the present study have validated the ATP bioluminescence method for evaluating the bacterial viability in an *in vitro* biofilm model. It has also been demonstrated the utility of this *in vitro* biofilm model to test the antimicrobial effect of mouthrinses.

## References

- Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc.* 2006;137:1649-57.
- Barnett ML. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc.* 2006;137:16S-21S.
- Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control. *Braz Oral Res.* 2009;23:39-48.
- Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol.* 1998;69:269-78.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:435-64.
- Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:114-22.
- Filoché S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010;89:8-18.
- Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res.* 2001;80:1436-40.
- Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res.* 2002;36:93-100.
- Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1461-68.
- Takenaka S, Trivedi HM, Corbin A, Pitts B, Stewart PS. Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:1869-75.
- Sliepen I, Van Essche M, Quirynen M, Teughels W. Effect of mouthrinses on Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilms in a hydrodynamic model. *Clin Oral Investig.* 2010;14:241-50.
- Breeuwer P, Abee T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol.* 2000;55:193-200.
- Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:3513-15.
- Arakawa H, Karasawa K, Igarashi T, Suzuki S, Goto N, Maeda M. Detection of cariogenic bacteria genes by a combination of allele-specific polymerase chain reactions and a novel bioluminescent pyrophosphate assay. *Anal Biochem.* 2004;333:296-302.
- Schwarz F, Sculean A, Romanos G, Hertzen M, Horn N, Scherbaum W, et al. Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants. *Clin Oral Investig.* 2005;9:111-17.
- Pellegrini P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell DA, Jr., Maier T, et al. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135:426-29.
- Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent.* 2010;38:S16-20.
- Chen F, Cushion MT. Use of an ATP bioluminescent assay to evaluate viability of *Pneumocystis carinii* from rats. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2791-2800.
- Sanchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, Leon R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontol Res.* 2011;46:252-60.
- Noiri Y, Okami Y, Narimatsu M, Takahashi Y, Kawahara T, Ebisu S. Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* strain 381 in biofilms. *J Periodontol.* 2003;74:1647-51.
- Takeuchi Y, Guggenheim B, Filieri A, Baehni P. Effect of chlorhexidine/thymol and fluoro-rinse varnishes on dental biofilm formation *in vitro*. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:468-72.
- Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent.* 2010;38:S6-10.
- Brex M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G. Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis

Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013 Jan 1;18 (1):e86-92.

Validation of ATP bioluminescence in an *in vitro* subgingival-biofilm model

- and plaque bacteria vitality. J Clin Periodontol. 1990;17:292-97.
25. Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M. Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. Eur J Oral Sci. 1995;103:355-61.
26. Gallez F, Fadel M, Scruel O, Cantraine F, Courtois P. Salivary biomass assessed by bioluminescence ATP assay related to (bacterial and somatic) cell counts. Cell Biochem Funct. 2000;18:103-8.
27. Fazilat S, Sauerwein R, McLeod J, Finlayson T, Adam E, Engle J, et al. Application of adenosine triphosphate-driven bioluminescence for quantification of plaque bacteria and assessment of oral hygiene in children. Pediatr Dent. 2010;32:195-204.

**Conflict of interest statement:** The authors declare that they do not have any conflict of interest in relation to this investigation

#### *Acknowledgements*

We thank Javier Pizarro Delgado, from the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medicine Faculty, Complutense University, Madrid, for their technical assistance.

The study was funded through a CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) Research Project with the Ministry of Science and Innovation and the company DENTAID, SA.



### 3. ESTUDIO 3

Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, Herrera D, Sanz M. Analysis of viable versus dead *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* using selective quantitative real-time PCR with propidium monoazide. *Journal of Periodontal Research* 2013; 48:213–220.

#### RESUMEN

**Antecedentes y objetivo:** una de las mayores desventajas del diagnóstico microbiológico basado en el ADN es la incapacidad de algunas técnicas para diferenciar entre el ADN de las células vivas y de las muertas, de vital importancia cuando se estudian patógenos etiológicamente relevantes. El objetivo de este trabajo ha sido optimizar un método para la detección y cuantificación selectiva de células vivas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, combinando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y el compuesto monoazida de propidio (PMA).

**Materiales y método:** se utilizaron tres concentraciones finales diferentes de PMA (10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) con una suspensión de  $10^6$  unidades formadoras de colonia (UFC)/mL de células vivas/muertas de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Después de la extracción del ADN, se llevó a cabo la qPCR utilizando *primers* y sondas específicos para cada bacteria. La actividad del PMA fue a continuación testada con muestras que contenían diferentes ratios de células vivas y muertas. La eficacia del PMA para diferenciar entre células vivas y muertas fue analizada mediante el análisis de la varianza.

**Resultados:** para estas bacterias patógenas concretas, el uso de PMA, a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , se traduce en una reducción significativa de la amplificación por qPCR cuando la muestra presenta todas las células muertas ( $10^6$

UFC/mL), mientras que dicha reducción no se detecta cuando todas las células están vivas. El PMA ha sido también eficaz detectando selectivamente las células vivas por qPCR en muestras que presentaban células vivas y muertas, conjuntamente, a diferentes ratios.

**Conclusiones:** este estudio demuestra la eficacia del PMA para diferenciar entre células vivas y muertas de las bacterias *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Este método podría ser útil para monitorizar nuevas estrategias antimicrobianas y para evaluar el potencial patogénico de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en diferentes situaciones orales, usando métodos de diagnóstico basados en técnicas moleculares.

# Analysis of viable vs. dead *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* using selective quantitative real-time PCR with propidium monoazide

M. C. Sánchez, M. J. Marín,  
E. Figuero, A. Llama-Palacios,  
D. Herrera, M. Sanz  
ETEP (Aetiology and Therapy of Periodontal  
Diseases) Research Group, University  
Complutense of Madrid, Madrid, Spain

Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, Herrera D, Sanz M. Analysis of viable vs. dead *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* using selective quantitative real-time PCR with propidium monoazide. *J Periodontol Res* 2013; 48: 213–220. © 2012 John Wiley & Sons A/S

**Background and Objectives:** One of the major disadvantages of DNA-based microbial diagnostics is their inability to differentiate DNA between viable and dead microorganisms, which could be important when studying etiologically relevant pathogens. The aim of this investigation was to optimize a method for the selective detection and quantification of only viable *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* cells by combining quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and propidium monoazide (PMA).

**Material and Methods:** Three different concentrations of PMA (10, 50 or 100  $\mu\text{M}$ ) were added to suspensions of  $10^6$  (CFU)/mL of viable/dead *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* cells. After DNA isolation, qPCR was carried out using specific primers and probes for the tested bacteria. PMA was further tested with different mixtures containing varying ratios of viable and dead cells. The efficacy of PMA to detect viable/dead cells was tested by analysis of variance.

**Results:** For these specific bacterial pathogens, 100  $\mu\text{M}$  PMA resulted in a significant reduction of qPCR amplification with dead cells ( $10^6$  CFU/mL), while with viable cells no significant inhibition was detected. PMA was also effective in detecting selectively viable cells by qPCR detection, when mixtures of varying ratios of viable and dead bacteria were used.

**Conclusions:** This study demonstrated the efficiency of PMA for differentiating viable and dead *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* cells. This method of PMA-qPCR may be useful for monitoring new antimicrobial strategies and for assessing the pathogenic potential of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in different oral conditions when using molecular diagnostic methods.

Dr Mariano Sanz, Section of Periodontology,  
Faculty of Odontology, Plaza Ramón y Cajal s/  
n – Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain  
Tel: +(34) 913941901  
Fax: +(34) 913941910  
e-mail: marianosanz@odon.ucm.es

Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis*; propidium monoazide; quantitative real-time polymerase chain reaction

Accepted for publication July 18, 2012

The oral cavity of healthy individuals contains hundreds of different bacterial, viral and fungal species, which usually attach to hard surfaces and form matrix-embedded biofilms. Within this oral microbiota, varying environmental conditions contribute to the species composition of the different biofilms encountered. In healthy individuals, oral biofilms are typically comprised of gram-positive facultative anaerobes, but in periodontal diseases, such as gingivitis and chronic periodontitis, subgingival biofilms increase in volume and in complexity with higher proportions of gram-negative species and well-recognized pathogens (e.g. *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) (1). These complex biofilms induce a local chronic inflammatory response that might lead to the destruction of the tooth-supporting tissues, which is the characteristic pathology in chronic periodontitis.

Owing to the significant association between the presence of bacterial pathogens *P. gingivalis* and *A. ggregatibacter actinomycetemcomitans* and the etiology and progression of periodontitis, their identification using both cultivation and molecular identification methods has been the target of many investigations. Although the detection and identification of bacterial species in subgingival plaque samples using cultural techniques has been the traditional gold standard diagnostic method, the advent of molecular techniques has improved extensively our knowledge on the microbial composition of subgingival plaque samples.

Cultural techniques have disadvantages, being expensive and laborious intensive procedures that require relatively long times for the growth of colonies, what limits the number of samples that can be evaluated. Moreover, the viable plate count method is highly dependent on the different growth media used and the likely microbial interactions occurring during growth (2). Its main advantage, however, is the maintenance of bacterial viability throughout the

diagnostic process, from sampling to plate counting, which assures the metabolic and reproductive activity of isolates.

Culture-independent molecular methods for identification and quantification of subgingival pathogens have been developed during recent years (3–8). Among the available alternatives, quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) represents a rapid method not only able to detect, but also to accurately quantify pathogenic bacteria in oral samples (9–11). The attractiveness of PCR-based techniques includes their enhanced specificity and sensitivity over traditional culture techniques, as well as their ability to obtain results more rapidly (12). In spite of these advantages, a major disadvantage of PCR is that it detects DNA from both viable and dead bacterial cells, due to the relatively long persistence of DNA after cell death and, therefore, DNA-based diagnostics may overestimate the number of live cells. In fact, DNA derived from cells destroyed by heat, disinfectants or antibiotics may serve as a template for PCR amplification from days up to 3 wks following their loss of viability (13–16).

Several authors have attempted to detect only viable cells by identifying mRNA using reverse transcriptase PCR (17,18). The reproducibility in determining viable and dead cell counts accurately with this technique is hampered, however, by the use of mRNA as the target (19). Other currently applied microbial diagnostic methods able to discern between viable and dead cell methods are based on microscopy and flow cytometry using BacLight™ (Invitrogen, Life Technologies Ltd, Paisley, UK) staining kits (20–24), although their capability of identifying viable cells has a narrower detection range than culturing (14).

In the last few years, a novel alternative has been developed based on the presence of membrane integrity as the criterion for distinguishing between viable and irreversibly damaged cells. Live cells with intact membranes have the ability to exclude DNA binding dyes that easily pene-

trate dead or membrane-compromised cells. This DNA-based methodology combines the use of a live/dead discriminating dye, propidium monoazide (PMA) with the speed and sensitivity of qPCR. It has been tested with a diversity of bacterial species, being able to differentiate between viable and dead cells (2,19,25–30). The possible influence of PMA on the qPCR signal has also been thoroughly investigated (10,15,31,32).

PMA is a DNA-intercalating dye with the azide group allowing covalent binding to DNA between the bases, with little or no sequence preference, when exposed to bright visible light (maximum absorbance at 460 nm). PMA is impermeable to intact cell membranes, and thus, can only react with DNA from dead cells or those with compromised membrane integrity. Upon penetrating compromised cell membranes, photolysis of PMA using a bright visible light produces a nitrene that forms a covalent link with DNA and other related molecules (15). Photo-induced PMA cross-linking will therefore, inhibit PCR amplification of DNA from dead cells, while not affecting the DNA from viable cell. Compared to unbound DNA, PMA-bound DNA leads to a reduction in qPCR signal, which reduces the qPCR bacterial cell counts.

Owing to the intrinsic characteristics of each microorganism and the different requirements of the assay conditions (e.g. time and temperature of incubation with DNA-intercalating dyes, such as PMA or etidium monoazide), time to exposure to light source and amplification efficiency of the qPCR assay, this methodology may produce heterogeneous results. Moreover, insufficient differentiation of live and dead cells has been reported with various bacteria when using this methodology (e.g. *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes*) (33). It is, therefore, necessary to test this methodology with each target pathogen to ensure a successful differentiation between viable and dead DNA cells. It is the goal of this investigation to test the use of PMA in conjunction with qPCR

in the detection and quantification of the main, recognized periodontal pathogens in the subgingival microbiota, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*.

## Material and methods

### Bacterial strains and culture conditions

Standard reference strains of *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 8324 and *P. gingivalis* ATCC 33277 were used in this investigation. The selected bacteria were grown on blood agar plates (Blood Agar Oxoid no. 2; Oxoid, Basingstoke, UK), supplemented with 5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/mL hemin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 1.0 mg/mL menadione (Merck, Darmstadt, Germany) in anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and balance N<sub>2</sub>) at 37°C for 24–72 h. Growth kinetic was calculated by generating growth curves of each bacteria in triplicate. Bacterial colonies were collected from the cultured blood agar plates and transferred to 12 mL of modified brain–heart infusion medium, and anaerobically incubated at 37°C for 24–48 h. This protein-enriched medium contains brain–heart infusion (Becton, Dickinson and Company; Becton, Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 2.5 g/L mucin (Oxoid), 1.0 g/L yeast extract (Oxoid), 0.1 g/L cysteine (Sigma), 2.0 g/L sodium bicarbonate (Merck), 5.0 mg/mL hemin (Sigma), 1.0 mg/mL menadione (Merck) and 0.25% (v/v) glutamic acid (Sigma). After incubation, the bacteria were harvested in the late exponential growth phase and added to fresh modified brain–heart infusion medium to begin the growth curve at the lag phase [0.05 of optical density (OD) at 550 nm using a spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)]. At specified time intervals, measurements of the OD at 550 nm were made and 100 µL aliquots were taken. These aliquots were diluted serially in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2; 0.1 mol/L), plated in duplicate on supplemented blood agar plates, and incubated in anaerobic conditions at

37°C for 4–7 d. After incubation, the counts of the total number of colony-forming units per milliliter (CFU/mL) of samples were calculated. Bacterial colonies were collected from the cultured blood agar plates and transferred to 12 mL of modified brain–heart infusion medium, and anaerobically incubated at 37°C for 24–48 h. At the exponential growth phase, the concentration of grown bacteria in the obtained suspension was determined by OD at 550 nm and adjusted to concentrations of 10<sup>6</sup> CFU/mL by serial dilutions if necessary in the same growth medium. The concentration was confirmed by plating 100 µL aliquots diluted serially in PBS in duplicate on supplemented blood agar plates, incubated in anaerobic conditions at 37°C for 4–7 d. After incubation, the counts of the total number of CFU/mL were carried out.

### Inactivation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*

Two hundred and fifty microliter aliquots of a 10<sup>6</sup> CFU/mL cell suspension of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were inactivated by exposure to 70% isopropanol for 10 min. Then, the isopropanol was removed by centrifugation at 9000 g for 5 min before resuspension in 250 µL of PBS. Three different mixed bacterial cultures prepared on separate days were performed (*n* = 3). The absence of viable cells was confirmed by culturing an aliquot of the treated cells on supplemented blood agar plates for 72 h at 37°C in anaerobic conditions.

### Propidium monoazide treatment in viable/dead isolates

PMA (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) was added at final concentrations of 10, 50 or 100 µM to sample tubes containing 250 µL of either viable or isopropanol-killed cells (all derived from a 10<sup>6</sup> CFU/mL cell suspension). Following an incubation period of 10 min at 4°C in the dark, the samples were subjected to photo-induced cross-linking of PMA by light

exposing for 20 min using a 550 W halogen light source, placed 20 cm above the samples. The sample tubes were laid horizontally on ice during this period to avoid excessive heating. After photo-induced cross-linking, the cells were centrifuged at 9000 g for 3 min before DNA isolation. To control for any influence on the bacteria viability of the process alone (incubation at 4°C and exposure to light source), 250 µL of viable and isopropanol-killed cells (all derived from a 10<sup>6</sup> CFU/mL cell suspension) subjected to the same process, but without exposure to PMA, were used as control samples. Three different experiments prepared on separate days were performed (*n* = 3).

### Propidium monoazide treatment in mixed viable/dead isolates

After the isopropanol killing of a 10<sup>6</sup> CFU/mL cell suspension of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* as described, dead cells were mixed with viable cells (10<sup>6</sup> CFU/mL) in defined proportions. The mixtures were prepared where viable cells represented 100%, 75%, 50%, 25% or 0% of the total bacterial cell concentration. PMA treatments were carried out in triplicate on 250 µL of the cell mixtures using 100 µM PMA, 10 min of incubation in the dark at 4°C and then exposed to the light for 20 min. As controls, the same mixtures with decreasing proportions of viable cells, but without any PMA treatment, were assessed. Then, all samples were subject to genomic DNA isolation following the protocol described afterwards.

### DNA isolation and quantitative PCR

The DNA was isolated from all PMA-treated samples and from controls using a commercial kit (ATP Genomic DNA Mini Kit<sup>®</sup>; ATP Biotech, Taipei, Taiwan), following the manufacturer's instructions. The hydrolysis probes 5' nuclease assay PCR method was used for detecting and quantifying bacterial DNA. Primers (synthesized by Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and probes (synthesized by Applied Biosystems,

Carlsbad, CA, USA) were targeted against 16S rRNA genes for both *A. actinomycetemcomitans* [forward (F): 5'-GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA-3' reverse (R): 5'-TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC-3', probe: 5'-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA GGG-3' (34); Amplicon size: 80 bp] and *P. gingivalis* [(F): 5'-GCGCTCAA CCGTTCAGCC-3', (R): 5'-CACGAAT TCCGCCTGC-3', Probe: 5'-CAC-TGAAGCTCAAGCCCGGCAGTTTC AA-3' (35); Amplicon size: 67 bp]. PCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 20 µL. The reaction mixtures contained 10 µL of 2× TaqMan master mixture (Taqman Gene Expression Master Mix<sup>®</sup>; Applied Biosystems), optimal concentrations of primers and probe (300, 300 and 100 nM for *A. actinomycetemcomitans*, and 300, 300 and 300 nM, for *P. gingivalis*), and 5 µL of DNA from samples. The negative control used was 5 µL of sterile water [no template control (NTC)]. The samples were subjected to an initial amplification cycle of 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Quantitation was achieved through the use of calibration curves in each run. Purified genomic DNA of both bacteria, *P. gingivalis* strain ATCC 33277 and *A. actinomycetemcomitans* strain DSMZ 8324, was obtained from 10<sup>9</sup> CFU/mL axenic suspensions following the described protocol of DNA isolation. CFU/mL was determined by OD at 550 nm based on the growth curves generated and confirmed by plated 100 µL aliquot, diluted serially in PBS in duplicate on supplemented blood agar plates, incubated in anaerobic conditions at 37°C for 4–7 d. After incubation, counts of the total number of CFU/mL were carried out. Purified DNAs were measured by using the Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) to determine their purity and concentration. Serial dilutions of purified DNA, with a range 10<sup>9</sup>-10 CFU/mL correspondence, were prepared as stock solutions and conserved at -20°C. The samples were analyzed with a FASTA HT 7900 thermocycler

(Applied Biosystems). The plates used in the study were transparent MicroAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-Well reaction Plate (0.1 mL) (Applied Biosystems), sealed by MicroAmp<sup>™</sup> Optical Adhesive Film (Applied Biosystems).

To verify analytical specificity, homologies of the selected primers and the probe with unrelated sequences were checked by a search with the BLAST program from the National Center for Biotechnology Information. Additionally, qPCR was performed to confirm the amplicon size obtained. The band position of the PCR products was in accordance with the expected amplicon length. The repeatability of the assay was ensured with the same sample analyzed twice in the same assay. The sensitivity (expressed as the limit of detection, LOD) was based on the calibration curves and the NTCs values obtained.

#### Data analyses

The Cq [quantification cycle, previously known as threshold cycle (Ct)] values and correlations with CFU/mL (based on calibration curves in each run) were automatically generated through the SDS 2.3 SOFTWARE<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Data were expressed as mean and standard deviation (SD). All assays presented act in accordance with the premise of calibration curves with slope range 3.3–3.5 cycles/log decade,  $r^2 = 0.99$  and efficiency range 1.9–2.0.

Kolmogorov–Smirnov goodness-of-fit tests were computed for each variable to evaluate the normality of the distribution. Analysis of variance (ANOVA) and post hoc testing with Bonferroni's correction for multiple comparisons were used. Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . A software package (IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> STATISTICS 19.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used for all data analysis.

## Results

### Effects of propidium monoazide on dead cells

Table 1 depicts the effectiveness of PMA on *A. actinomycetemcomitans*

and *P. gingivalis* suspensions of dead cells, comparing the qPCR results after using different concentrations of PMA (10, 50 and 100 µM) with the positive controls, without PMA exposure. The Cq values of dead cells treated with PMA gradually increased with the increased concentration of PMA used, which indicates a reduction in the amplification of DNA derived from cells killed by isopropanol, and therefore, a reduction in the amounts of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. For both bacterial species, the mean Cq values at 100 µM PMA fell below the LOD. These results showed that 100 µM PMA was effective in preventing qPCR amplification of the target sequence from the dead cell suspension for both bacterial species. For *P. gingivalis*, similar results were obtained at 50 µM PMA.

Non-significant differences in Cq values were observed for *A. actinomycetemcomitans* when comparing isopropanol-killed cells treated with 10 µM PMA to the positive control (1.2, SD = 1.4;  $p = 1.00$ ). The treatment of isopropanol-killed *A. actinomycetemcomitans* cells with 50 or 100 µM PMA resulted in Cq values below the detection limit [29.0 (SD = 0.1)]. In the case of *P. gingivalis*, statistically significant differences in Cq values were observed when comparing isopropanol-killed cells treated with 10 µM PMA to the positive control (4.5, SD = 0.7;  $p < 0.01$ ) and the treatment with 50 or 100 µM PMA resulted in Cq values below the detection limit [32.1 (SD = 0.1)].

Cq values were used to determine the correlation between the numbers of CFU/mL obtained from qPCR assays. Figure 1 illustrates the effect of different concentrations of PMA on the log CFU/mL in the isopropanol-killed bacterial suspension. Compared to the positive control, statistically significant differences in the number of CFU/mL were observed for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, when dead cells were treated with 50 and 100 µM ( $p < 0.05$ ). For both bacterial species, no statistically significant differences were found when the three PMA

Table 1. Effect of increasing propidium monoazide (PMA) concentration on viable and isopropanol-killed *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* cells. The Cq values indicate the mean values of three independent experiments with the standard deviations (SD)

	Cq values [mean value (SD)]							
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>				<i>P. gingivalis</i>			
	Non-PMA	10 µM PMA	50 µM PMA	100 µM PMA	Non-PMA	10 µM PMA	50 µM PMA	100 µM PMA
Viable cells	22.1 (0.2)	22.6 (0.3)	23.0 (0.2)	23.2 (0.2)	22.8 (0.7)	22.0 (0.5)	22.4 (0.4)	22.7 (0.5)
Dead cells	23.8 (0.7)	28.0 (3.9)	29.2 (2.8) <sup>a</sup>	30.8 (0.8) <sup>a</sup>	26.5 (1.6)	31.4 (1.1)	32.2 (0.7) <sup>a</sup>	32.8 (0.8) <sup>a</sup>
Limit of detection	29.0 (0.1)	29.0 (0.1)	29.0 (0.1)	29.0 (0.1)	32.1 (0.4)	32.1 (0.4)	32.1 (0.4)	32.1 (0.4)
No template control	34.1 (0.4)	34.1 (0.4)	34.1 (0.4)	34.1 (0.4)	35.8 (1.6)	35.8 (1.6)	35.8 (1.6)	35.8 (1.6)

<sup>a</sup>Value below detection limit.

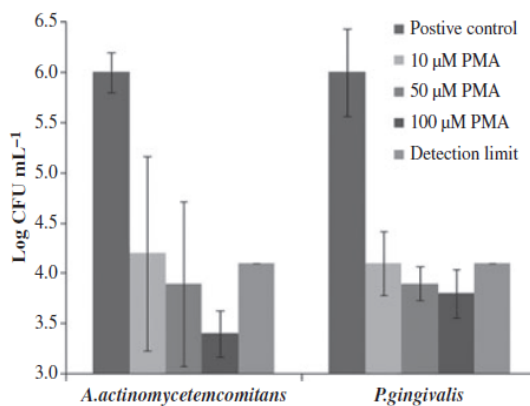


Fig. 1. Effect of propidium monoazide (PMA) on isopropanol-killed bacterial suspension: dead bacterial suspension, containing 10<sup>6</sup> colony forming units (CFU)/mL for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, were subjected to increasing concentrations of PMA. The effects are shown as the log conversion of CFU/mL. The bars indicate mean values of three independent experiments, and the error bars indicate standard deviations.

concentrations used to treat dead cells were compared ( $p = 1.00$ ).

**Effects of propidium monoazide on viable cells**

Table 1 shows the effect of PMA on *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* viable cell suspensions, comparing the qPCR results after using different concentrations of PMA (10, 50 and 100 µM) with the corresponding viable cell suspensions without PMA exposure. For both *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, Cq values of 22.1 (SD = 0.2) and 22.8 (SD = 0.7), respectively, derived from viable cells not treated with PMA, were similar to the obtained Cq values with the same cell suspensions treated with PMA (Table 1). For both bacterial species, no statistically significant differences in

Cq values and/or log CFU/mL were observed ( $p > 0.05$ ) when the three PMA concentrations were used with viable cells or when compared with the viable cell suspension not subjected to PMA treatment. No statistically significant differences were found when the three concentrations used to treated isopropanol-killed cells were compared ( $p > 0.05$ ).

**Effects of propidium monoazide on mixtures of viable and dead cells**

The efficiency of PMA in selectively allowing DNA amplification from viable cells in the presence of dead cells was evaluated. Table 2 depicts the effect of PMA on *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* suspensions where both viable and dead cells were combined. When viable/dead mixed

bacterial cells were similarly treated with 100 µM PMA before DNA extraction, Cq values gradually increased from 23.0 (SD = 0.8) to 28.9 (SD = 0.2) for *A. actinomycetemcomitans*, and from 25.3 (SD = 0.8) to 32.7 (SD = 1.0) for *P. gingivalis*, as the percentage of viable cells decreased; therefore, demonstrating a relationship between Cq values and number of viable cells present in a sample. Figure 2 represents a linear relationship between the Cq values and log number of CFU/mL in the viable/dead cell mixtures after the PMA and qPCR reaction for both *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*.

**Discussion**

The results of the present study have demonstrated that PMA at 100 µM was able to prevent qPCR amplification of DNA from dead cells of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* and, in the case of *P. gingivalis*, at 50 µM PMA. These results were confirmed when the same PMA treatment was applied to viable cells (no effect observed) or to a combination of viable/dead cells.

Successful qPCR quantification was obtained when tested in viable as well as dead bacterial suspensions of both *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. Cq values derived from viable and isopropanol-killed positive controls, subjected to the treatment conditions but without the exposure of PMA, indicated that the qPCR technique quantified DNA from viable cells and from dead cells. This amplification of DNA from dead cells may lead to false positive results when using PCR

Table 2. Effect of propidium monoazide (PMA) treatment on defined proportions of viable and isopropanol-killed *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* cell mixtures

	Cq values [mean value (standard deviation (SD))]									
	Ratio of viable/dead cells (%/%)									
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>					<i>P. gingivalis</i>				
	100 : 0	75 : 25	50 : 50	25 : 75	0 : 100	100 : 0	75 : 25	50 : 50	25 : 75	0 : 100
Viable/dead cells: Non-PMA-treated cells	20.4 (0.4)	21.3 (1.3)	21.2 (0.6)	21.9 (0.3)	22.9 (0.7)	23.8 (0.6)	24.2 (0.9)	24.6 (0.6)	25.4 (0.6)	28.1 (0.8)
Viable/dead cells: PMA-treated cells	23.0 (0.8)	23.9 (0.5)	24.8 (0.9)	25.5 (0.7)	28.9 (0.2)	25.3 (0.8)	26.5 (0.6)	26.5 (0.8)	26.9 (0.7)	32.7 (1.0)
Limit of detection	29.0 (0.1)	29.0 (0.1)	29.0 (0.1)	29.0 (0.1)	29.0 (0.1)	32.1 (0.4)	32.1 (0.4)	32.1 (0.4)	32.1 (0.4)	32.1 (0.4)

Mixtures were prepared with viable cells representing 100%, 75%, 50%, 25% or 0% of the total bacterial cell concentration (10<sup>6</sup> CFU/mL). A final concentration of 100 µM of PMA was used. The Cq values indicate the mean values of three independent experiments with the standard deviations. NTC ranged between 34.1 (SD = 0.4) for *A. actinomycetemcomitans* and 35.8 (SD = 1.6) for *P. gingivalis*.

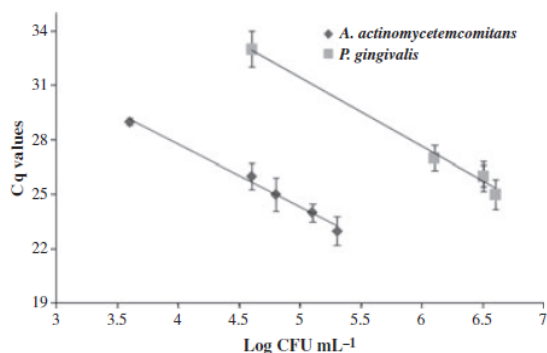


Fig. 2. Relationship between the log colony forming units (CFU)/mL and Cq values from propidium monoazide (PMA) q PCR amplification of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. Total number of cells in viable–dead cell mixtures was kept constant at 10<sup>6</sup> CFU/mL. Mixtures were prepared such that viable cells represented 100%, 75%, 50%, 25% or 0% of the total bacterial cell concentration. A final concentration 100 µM of PMA was used. Plotted values are the means and standard deviations derived from three independent assays.

technology and, therefore, the use of molecular methods for detecting and quantifying specific species in mixed bacterial samples must determine whether the DNA amplification results from viable or dead bacteria. This is particularly useful in studies evaluating the pathogenic potential of the target species in relation to the studied pathological process, as well as when determining the efficacy of antimicrobial therapies on biofilms or bacterial communities. Both objectives are important for the specific bacterial species tested in this investigation. *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* are well-recognized periodontal pathogens,

strongly associated with periodontitis (36) and, therefore, studies evaluating their etiological role in the initiation and progression of this disease must assure that the number of these species retrieved from subgingival samples represents viable cells. Similarly, studies evaluating the efficacy of different antimicrobial strategies on subgingival biofilms, including targeted strategies against the two mentioned species, must assure that the quantification of bacteria account for differences between viable and dead cells.

Cq values from viable cell suspensions, regardless of PMA treatment, were compared with those obtained

from the positive control (dead cells without exposure to PMA). Although Cq values from viable cells suspensions were significantly lower than the obtained from the positive control, only a limited proportion of genomic DNA was destroyed during exposure of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* cells to isopropanol, providing suitable DNA template for PCR amplification.

In view of the fact that isopropanol can cause destruction of a greater proportion of genomic DNA than other killing methods (16), an alternative method of killing cells, by heat treatment at 95°C for 10 min, was used as the control to ensure that isopropanol did not interfere with the results. For a given Cq value from viable cell suspensions regardless of PMA treatment [25.2 (SD = 0.1) for *A. actinomycetemcomitans* and 24.5 (SD = 0.0) for *P. gingivalis*], the Cq values from positive controls obtained by heat treatment [26.7 (SD = 0.0) for *A. actinomycetemcomitans* and 27.4 (SD = 0.2) for *P. gingivalis*] demonstrated similar behavior to those obtained by the isopropanol-killing method [26.0 (SD = 0.1) for *A. actinomycetemcomitans* and 26.9 (SD = 0.1) for *P. gingivalis*].

In agreement with previous reports, our results showed that PMA treatment did not significantly inhibit DNA amplification from viable cells, while there was a significant reduction of DNA amplification from dead cells

(2,15,16,19,28,32). For both bacterial species, no statistically significant differences in C<sub>q</sub> values and/or log CFU/mL were observed ( $p > 0.05$ ), when the three PMA concentrations were used with viable cells, in comparison with the same cells without PMA treatment. The PMA charge and lack of permeability of this molecule through intact cell membranes are the main reasons for the minimal effect on viable cells (15).

The evaluation of the efficacy of PMA combined with the qPCR reaction on mixed (viable/dead) bacterial suspensions, at different proportions, resulted in a linear relationship between C<sub>q</sub> values and number of viable cells, demonstrating an increase in C<sub>q</sub> values with the decreasing number of viable bacteria. This result further demonstrates that PMA is effective in selectively allowing PCR amplification of DNA from viable cells, also in the presence of DNA from dead cells. These results are consistent with those described in previous studies using the same methodology, when applied in different bacterial species (2,19,25–30). These authors also reported a successful inhibition of qPCR amplification of DNA in the presence of dead cells. There are few reports about this technology being applied to the study of oral bacteria (28,29). Recently, a similar report comparing the effect of two DNA-intercalating dyes (etidium monoazide and PMA) on three oral bacteria, including *A. actinomycetemcomitans* (28), was published. Our investigation provides additional insight into the use of this method for quantifying viable *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*.

Their results showed a lesser initial reduction in the qPCR signal derived from dead cells treated with PMA than we have reported in this investigation. This fact was attributed to the amplicon size used (82 bp) (28,32), achieving better results when expanded the amplicon size to 200 bp. Because amplicon sizes larger than 150 bp are not approved for the qPCR technique, in our investigation we have successfully used an amplicon of 80 bp, and hypothesized that the improved results obtained using this methodology with *A. actinomycetem-*

*comitans* might be due to the assay conditions, rather than the size of amplicons. The tight control of temperature, time of incubation, time of light exposure, amplification efficiency of the qPCR assay and quantity of unspecific background DNA in the reaction might be crucial for attaining improved results. Moreover, we have proven in this study that an amplicon of 80 bp was sufficient to demonstrate a positive PMA effect on the dead cells. In addition, we have studied (data not shown) the effect of PMA on purified DNA from *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, and inhibition of the DNA-qPCR amplification was complete.

To determine optimal assay conditions for allowing the penetration of PMA through membrane-compromised *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* cells, bacterial suspensions were subjected to different temperatures and different periods of cross-linking and light exposure (data not shown). In an initial set of experiments, 100 µM PMA was selected as the final concentration and added to 250 µL culture aliquots, following an incubation period from 1 to 10 min in the dark at 4°C and ambient temperature. After that, samples were subjected to cross-linking of PMA by exposing them to a halogen light source of 550 W placed 20 cm above the samples for 5–20 min. An incubation time of 10 min at 4°C in the dark with PMA and an exposure of 20 min to the light source proved the most effective conditions for these bacteria. A concentration of 10<sup>6</sup> CFU/mL was selected for validating the method, as previous experiments performed using this methodology in a subgingival biofilm model development by our research group (23), used the selected bacteria at this concentration. This methodology will allow us not only to study *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* dynamics within the biofilm, but also to assess the efficacy of different antiseptic compounds on these pathogens within this biofilm model.

The bacterial detection within the range of 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> CFU/mL was limited by contamination from bacterial DNA. This unspecific signal, conceivably con-

ferred by the Taq DNA polymerase and PCR reagents, has been previously reported (19,31). Measures to avoid carryover DNA have been established; for example, separation of pre- and post-PCR laboratory area, use of flow cabin, barrier tips or disposable gloves. None of these methods, however, proved very effective in reducing copy numbers of bacterial ribosomal DNA in the PCR reagents. Although C<sub>q</sub> of 40 are theoretically available for the reaction, contamination of reagents with a non-specific DNA background manifest in the NTCs, restricted the sensitivity of the reaction to C<sub>q</sub> values between 34.1 (SD = 0.4) for *A. actinomycetemcomitans* and 35.8 (SD = 1.6) for *P. gingivalis* (Table 1). This fact may be responsible for dead cell suspensions demonstrating a quantifiable value using qPCR when combined with PMA. In this investigation, cell death was confirmed in all cases by culture methods, although it is conceivable that in some cases, these quantifiable values from dead cell suspensions were due to an insufficient capacity of isopropanol treatment to kill all the cells, which may have remained viable but not cultivable.

In conclusion, this method of PMA treatment of mixed bacterial suspensions followed by q-PCR analysis, has demonstrated its efficacy for rapid detection and quantification of viable *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, as well as its efficacy for preventing DNA amplification from the dead cells. The results have demonstrated the potential of this methodology (PMA combined with qPCR) for differentiating viable and dead *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in oral samples.

#### Acknowledgements

The study was supported by means of a CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) Research Project with the Ministry of Science and Innovation and the company DENTAID, SA. We thank Rosa María Pérez Díaz, from the Genomics Unit at the UCM-Parque Científico, Madrid, for their technical assistance.

References

1. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 2010;**89**:8–18.
2. Kramer M, Obermajer N, Bogovic Matijasic B, Rogelj I, Kmetec V. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;**84**:1137–1147.
3. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004;**31**:1034–1047.
4. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y. Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:3827–3830.
5. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:2015–2021.
6. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2007;**78**:79–86.
7. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:1407–1417.
8. Teles FR, Teles RP, Uzel NG et al. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2011;**47**:95–104.
9. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006;**33**:427–433.
10. Nocker A, Camper AK. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett* 2009;**291**:137–142.
11. Park SN, Park JY, Kook JK. Development of *Porphyromonas gingivalis*-specific quantitative real-time PCR primers based on the nucleotide sequence of rpoB. *J Microbiol* 2011;**49**:315–319.
12. Olsen JE, Aabo S, Hill W et al. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int J Food Microbiol* 1995;**28**:1–78.
13. Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 2003;**810**:803–812.
14. Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, Holck AL. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:1018–1024.
15. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 2006;**67**:310–320.
16. Cawthorn DM, Witthuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol* 2008;**105**:1178–1185.
17. Novak JS, Juneja VK. Detection of heat injury in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Prot* 2001;**64**:1739–1743.
18. Bentsink L, Leone GO, van Beckhoven JR, van Schijndel HB, van Gemen B, van der Wolf JM. Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato. *J Appl Microbiol* 2002;**93**:647–655.
19. Lee JL, Levin RE. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish filets. *J Microbiol Methods* 2009;**76**:93–96.
20. Breeuwer P, Abebe T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* 2000;**55**:193–200.
21. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;**48**:1461–1468.
22. Slieden I, Van Essche M, Quirynen M, Teughels W. Effect of mouthrinses on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms in a hydrodynamic model. *Clin Oral Investig* 2010;**14**:241–250.
23. Sanchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, Leon R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontol* 2011;**46**:252–260.
24. Maezono H, Noiri Y, Asahi Y et al. Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;**55**:5887–5892.
25. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AK. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:5111–5117.
26. Pan Y, Breidt F Jr. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:8028–8031.
27. Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn J Infect Dis* 2010;**63**:119–123.
28. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. *Mol Oral Microbiol* 2011;**26**:253–261.
29. Takahashi Y, Yoshida A, Nagayoshi M et al. Enumeration of viable *Enterococcus faecalis*, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 2011;**55**:889–892.
30. Nam S, Kwon S, Kim MJ et al. Selective detection of viable *Helicobacter pylori* using ethidium monoazide or propidium monoazide in combination with real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 2011;**55**:841–846.
31. Hein I, Schneeweiss W, Stanek C, Wagner M. Ethidium monoazide and propidium monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal real-time PCR. *J Microbiol Methods* 2007;**71**:336–339.
32. Soejima T, Iida K, Qin T, Taniai H, Seki M, Yoshida S. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:2305–2313.
33. Flekna G, Stefanic P, Wagner M, Smulders FJ, Mozina SS, Hein I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res Microbiol* 2007;**158**:405–412.
34. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;**45**:191–199.
35. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:4950–4954.
36. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiology of periodontal disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, eds. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Copenhagen: Munksgaard, 2003: 216–242.

#### 4. ESTUDIO 4

Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an *in vitro* subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research* 2013; doi: 10.1111/jre.12073.

#### RESUMEN

**Antecedentes y objetivo:** la diferenciación entre células vivas y muertas es un importante factor a tener en cuenta cuando se utilizan técnicas de diagnóstico basadas en biología molecular. Esto es especialmente relevante cuando las bacterias han sido expuestas a un agente antimicrobiano. El objetivo de este estudio ha sido testar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) combinada con el compuesto monoazida de propidio (PMA), como método para la detección y cuantificación selectiva de las células vivas de *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* y de las bacterias totales en un modelo de biopelícula *in vitro* después de un tratamiento antimicrobiano.

**Materiales y método:** el método de PMA-qPCR ha sido testado en un modelo de biopelícula *in vitro*, usando alcohol isopropílico como agente antimicrobiano. Las biopelículas maduras se sometieron durante 1, 5, 10 y 30 min al alcohol por inmersión. Tras ello, las biopelículas se disgregaron y se trataron con PMA (concentración final 100 µM). Después de la extracción del ADN, se llevó a cabo la qPCR utilizando cebadores y sondas específicos para cada bacteria. La diferenciación entre células vivas y muertas fue analizada mediante el análisis de la varianza.

**Resultados:** cuando el PMA se usa en presencia de las bacterias vivas no se detecta ninguna inhibición significativa de la señal obtenida por qPCR ( $p > 0,05$  en todos los casos). En cambio, después de la inmersión de las biopelículas en alcohol isopropílico, el efecto del PMA se traduce en una reducción significativa de la señal de qPCR, para el total de las bacterias de hasta  $4 \log_{10}$ , para *P. gingivalis* de  $3 \log_{10}$ , y de  $2 \log_{10}$  para *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*.

**Conclusiones:** estos resultados demuestran la eficiencia del PMA para diferenciar entre células vivas y muertas de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y de las bacterias totales en un modelo de biopelícula *in vitro* después de un tratamiento antimicrobiano. Por consiguiente, este método podría ser útil para estudiar el efecto de productos antimicrobianos en biopelículas orales.

# Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an *in vitro* subgingival biofilm model

M. C. Sánchez<sup>1</sup>, M. J. Marín<sup>1</sup>,  
E. Figuero<sup>1</sup>, A. Llama-Palacios<sup>1</sup>,  
R. León<sup>2</sup>, V. Blanc<sup>2</sup>, D. Herrera<sup>3</sup>,  
M. Sanz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratory, Faculty of Dentistry, Complutense University of Madrid, Spain, <sup>2</sup>DentaId SA, Barcelona, Spain and <sup>3</sup>Etiology and Therapy of Periodontal Disease Research Group, Faculty of Dentistry, Complutense University of Madrid, Spain

Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an *in vitro* subgingival biofilm model. 2013; doi: 10.1111/jre.12073. © 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

**Background and Objectives:** Differentiation of live and dead cells is an important challenge when using molecular diagnosis for microbial identification. This is particularly relevant when bacteria have been exposed to antimicrobial agents. The objective of this study was to test a method using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) combined with propidium monoazide (PMA), developed for the selective quantification of viable *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* and total bacteria in an *in vitro* biofilm model after antimicrobial treatment.

**Material and Methods:** PMA-qPCR method was tested in an *in vitro* biofilm model, using isopropyl alcohol as the antimicrobial agent. Matured biofilms were exposed for 1, 5, 10 and 30 min to isopropyl alcohol by immersion. Biofilms were disrupted and PMA added (final concentration of 100 µM). After DNA isolation, qPCR was carried out using specific primers and probes for the target bacteria. The differentiation of live and dead cells was tested by analysis of variance.

**Results:** When PMA was used in the presence of viable target bacterial cells, no statistically significant inhibition of qPCR amplification was detected ( $p > 0.05$  in all cases). Conversely, after immersion in isopropyl alcohol of the biofilm, PMA resulted in a significant total reduction of qPCR amplification of about 4 log<sub>10</sub>. *P. gingivalis* showed a vitality reduction in the biofilm of 3 log<sub>10</sub>, while *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* showed a 2 log<sub>10</sub> reduction.

**Conclusion:** These results demonstrate the efficiency of PMA for differentiating viable and dead *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* cells, as well as total bacteria, in an *in vitro* biofilm model, after being exposed to an

Dr Mariano Sanz, Section of Periodontology, Faculty of Odontology, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain  
Tel: +(34) 913941901  
Fax: +(34) 913941910  
e-mail: marianosanz@odon.ucm.es

**Key words:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; antimicrobial agents; *Fusobacterium nucleatum*; oral biofilm; *Porphyromonas gingivalis*; propidium monoazide; quantitative real-time PCR

Accepted for publication February 02, 2013

antimicrobial agent. Hence, this PMA-qPCR method may be useful for studying the effect of antimicrobial agents aimed at oral biofilms.

Human dental plaque, consisting of dynamic and extremely complex biofilm organized on dental surfaces, is the major cause of caries and periodontal diseases (1). Within this ecosystem, the varying environmental and ecological conditions affecting the biofilm, contribute to changes its microbial composition. In oral health, it is typically comprised of gram-positive, facultative anaerobic bacteria; in the presence of disease, such as in gingivitis and chronic periodontitis, these biofilms increase in volume and complexity, with higher proportions of gram-negative bacteria and the presence of well-recognized pathogens (e.g. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*) (1).

Owing to the well described implications of these biofilms in the aetiology of caries and periodontal diseases, it is important to optimize methodologies to assess and quantify these microbial communities, as well as to study the impact on these biofilms of the different preventive and therapeutic antiplaque strategies, both mechanical and pharmacological (2–6). With this goal, mainly targeting on chemical plaque control, different simplified *in vitro* biofilm models have been developed (7–14). These investigations have shown that the effectiveness of antimicrobial agents is reduced by well-established physical and biological properties on these mature oral biofilms. In fact, when the same agents are tested with the same bacterial cells in planktonic growth, they have shown higher antimicrobial activity (1,15,16). These tested *in vitro* biofilm models however, do not lend themselves to testing against a consortium of anaerobic bacteria, including the above-mentioned periodontal pathogens. Thus, our research group has developed and tested an *in vitro* subgingival biofilm model that contains initial (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*),

early (*Veillonella parvula*) and secondary (*Fusobacterium nucleatum*) colonizers, as well as two well-known periodontal pathogens, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, thus simulating the *in vivo* composition of the subgingival microbiota (14).

For microbiological diagnosis, the use of nucleic acid base techniques, such as the polymerase chain reaction (PCR), have been widely employed for identifying and quantifying oral bacteria (17–27), but they are not widely used for assessing antimicrobial efficacy. These PCR-based techniques have shown a great advantage over traditional culture techniques in regards to their specificity and sensitivity, as well as in their ability to obtain results more rapidly. Nevertheless, bacterial DNA may persist in the environment for a long time after cell death, and, therefore, DNA-based diagnosis may overestimate the number of bacteria after an antimicrobial treatment (28–31). To overcome this problem, a method based on the use of discriminating dyes, such as propidium monoazide (PMA) or ethidium monoazide has been developed. It is based on the ability of these dyes to detect cell membrane integrity, and thus distinguish between viable and irreversibly damaged cells (26,28–37).

PMA is a DNA-intercalating dye with an azide group, which when exposed to bright visible light (maximum absorbance at 460 nm), promotes a covalent binding between the DNA bases, with little or no sequence preference (30). PMA, however, is impermeable to intact cell membranes, and thus, can only react with DNA in those cells that are dead or with significant compromised membrane integrity. When combined with PCR, the photo-induced PMA binding of DNA bases will inhibit the specific detection of DNA fragments in dead cells, hence only being able to detect live bacteria. This method has

been applied successfully in a broad range of environments and bacterial species, including planktonic oral bacteria (38–40), but never in oral biofilm systems.

It is, therefore, the objective of this investigation to evaluate the efficacy of using quantitative real-time PCR (qPCR) in conjunction with PMA, in an *in vitro* subgingival biofilm model, in the quantification of total viable bacteria as well as periodontal pathogens, after exposure to a potent antimicrobial agent.

## Material and methods

### Bacterial strains and culture conditions

Standard reference strains of *S. oralis* CECT 907T, *V. parvula* NCTC 11,810, *A. naeslundii* ATCC 19,039, *F. nucleatum* DMSZ 20,482, *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 8324 and *P. gingivalis* ATCC 33,277 were used. Bacteria were grown on blood agar plates (Blood Agar Oxoid No. 2; Oxoid, Basingstoke, UK), supplemented with 5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/mL hemin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 1.0 mg/mL menadione (Merck, Darmstadt, Germany) in anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and balance N<sub>2</sub>) at 37°C for 24–72 h.

### Saliva preparation

Unstimulated saliva was obtained from healthy volunteers in 10 mL aliquots at least 1.5 h after eating, drinking or tooth brushing. Each saliva sample was treated with 2.5 mmol/L DL-dithiothreitol (Sigma) for 10 min, with continuous stirring for reducing salivary protein aggregation. It was then centrifuged (10 min, 4°C, 9000 g) and the obtained supernatant diluted (1 : 1) with phosphate-buffered saline (PBS). The obtained sample was filtered and sterilized through a 0.22 µm pore size

Millex GV low-protein-binding filter  $\times$  50 (Millipore, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The efficacy of this protocol was assessed by plating processed saliva samples on to supplemented blood agar plates for 72 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and confirmed by the lack of any bacterial growth on either aerobically or anaerobically incubated plates.

#### Biofilm development

Biofilms were developed as previously described by Sánchez *et al.* (14). In brief, pure cultures of each bacteria were grown anaerobically in a protein-rich medium containing brain–heart infusion (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 2.5 g/L mucin (Oxoid), 1.0 g/L yeast extract (Oxoid), 0.1 g/L cysteine (Sigma), 2.0 g/L sodium bicarbonate (Merck), 5.0 mg/mL hemin (Sigma), 1.0 mg/mL menadione (Merck) and 0.25% (v/v) glutamic acid (Sigma). The bacterial growth was harvested at mid-exponential phase (measured by spectrophotometry), and a bacterial suspension in modified brain–heart infusion medium containing  $10^3$  colony forming units (CFU) per mL for *S. oralis*,  $10^5$  CFU/mL for *V. parvula* and *A. naeshundii*, and  $10^6$  CFU/mL for *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* was prepared. Sterile calcium hydroxyapatite disks of 7 mm of diameter and 1.8 mm (standard deviation, SD = 0.2) of thickness (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, USA) were coated with treated saliva for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in sterile plastic tubes, and then placed in the wells of a 24-well tissue culture plate (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany). Each well was inoculated with 1.5 mL mixed bacteria suspension prepared and incubated in anaerobic conditions (10%  $\text{H}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$  and balance  $\text{N}_2$ ) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 72 h. The plates employed for assessing the sterility of the culture medium were used as controls.

#### Antimicrobial treatment

Biofilms were gently washed with PBS to detach non-adhered cells and to

remove the culture medium. Then, the discs were immersed during 1, 5, 10 and 30 min in the antimicrobial solution consisting 70% isopropyl alcohol. As isopropanol causes cellular damage, it is expected that a significant number of the biofilm bacterial will become dead when exposed to this agent. After this treatment, the discs were sequentially washed three times in fresh PBS (immersion time per rinse, 10 s) to remove the antimicrobial solution. Negative controls were included, substituting the isopropanol solution by PBS. The experiments were repeated nine times ( $n = 9$ ), on different days and with fresh biofilm preparations.

#### Propidium monoazide treatment

After antimicrobial treatment, biofilms were disrupted by vortex for 2 min in 1 mL of PBS. PMA (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) was added to sample tubes containing 250  $\mu\text{L}$  of disaggregated biofilm cells, at a final concentration of 100  $\mu\text{M}$ . Following an incubation period of 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark, the samples were subjected to light exposure for 20 min, using a 550 W halogen light source, placed 20 cm above the samples. During this exposure, the sample tubes were laid horizontally on ice to avoid excessive heating. After PMA photo-induced DNA cross-linking, the cells were centrifuged at 12,000  $g$  for 3 min before DNA isolation. To control for any possible influence of the experimental process on bacterial viability, the same procedure (incubation at  $4^{\circ}\text{C}$  and exposure to light source), but without the exposure to PMA, was used as negative control.

#### DNA isolation and quantitative real-time polymerase chain reaction

The DNA was isolated from all samples using a commercial kit (ATP Genomic DNA Mini Kit<sup>®</sup>; ATP Biotech, Taipei, Taiwan) following the manufacturer's instructions. The hydrolysis probes 5' nuclease assay PCR method was used for detecting and quantifying the bacterial DNA. Primers [synthesized by Life Technologies Invitrogen (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA)] and probes [synthesized by Life Technologies Applied Biosystems (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)] sequences, targeted against 16S rRNA gene, are showed in Table 1. The qPCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 20  $\mu\text{L}$ . The reaction mixtures contained 10  $\mu\text{L}$  of 2  $\times$  master mixture (LC 480 Probes Master; Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), optimal concentrations of primers and probe (350, 350 and 100 nM for total bacteria; 300, 300 and 200 nM for *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 and 300 nM, for *P. gingivalis* and 600, 600 and 300 nM for *F. nucleatum*), and 5  $\mu\text{L}$  of DNA from samples. The negative control was 5  $\mu\text{L}$  of sterile water [no template control (NTC)] (Water PCR grade, Roche Diagnostic GmbH). The samples were subjected to an initial amplification cycle of  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Analyses was performed with a LightCycler<sup>®</sup> 480 II thermocycler (Roche Diagnostic GmbH). The plates used in the study were Fram-Star 480 of natural frame and white wells (4itude, The North Barn, Damp-hurst Lane, UK), sealed by QPCR Adhesive Clear Seals (4itude).

Each DNA sample was analysed in duplicate. Quantification cycle ( $C_q$ ) values, previously known as cycle threshold ( $C_t$ ) values, describing the PCR cycle number at which fluorescence rises above the baseline, were determined using the provided software package (Roche Diagnostic GmbH).

#### Quantification of viable cells by propidium monoazide-quantitative real-time polymerase chain reaction

Quantification of viable cells by qPCR was based on standard curves. One millilitre of viable *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* cell suspensions, as well as a mix of the six bacteria involved in biofilm suspension, containing  $10^{10}$  CFU/mL [determined by optical density at 550 nm, based on the growth curves previously generated (14), and confirmed by plating 100  $\mu\text{L}$  of diluted serially aliquots on supplemented blood agar plates at

4 Sánchez et al.

Table 1. Primers and probes used for quantification of genomic DNA from the target bacteria. Primers and probes were targeted against 16S rRNA gene

Bacteria	Sequence (5'-3')	Length (bp)	Reference
<i>Pg</i>			
Forward	GCGCTCAACGTTTCAGCC	67	(21)
Reverse	CACGAATTCGCGCTGC		
Probe	6FAM-CACTGAACTCAAGCCC GG CAGTTTCAA-TAMRA		
<i>Aa</i>			
Forward	GAACCTTAC CTACTCTTGACATCCGAA	80	(22)
Reverse	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC		
Probe	6FAM-AGAACTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA		
<i>Fn</i>			
Forward	GGATTTATTGGGCGTAAAGC	162	(22)
Reverse	GGCATTCTACAAATATCTACGAA		
Probe	6FAM-CTCTACACTGTAGTTCCG-TAMRA		
<i>Total bacteria</i>			
Forward	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	466	(44)
Reverse	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		
Probe	6FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-TAMRA		

Aa, *A. actinomycetemcomitans*; Fn, *F. nucleatum*; Pg, *P. gingivalis*.

37°C for 4–7 d, in anaerobic conditions] were treated or not with PMA (following the protocol described above). Cultures were subjected to DNA isolation using the kit ATP Genomic DNA Mini Kit®, following the manufacturer’s instructions. The DNA concentration was measured on a Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE, USA). Serial dilutions of each DNA were performed on sterile water (Water PCR grade, Roche Diagnostic GmbH), with a ranging 10<sup>10</sup>–10 CFU/mL correspondence, and subjected to the qPCR assay described above. Standard curves were constructed by plotting Cq values generated from qPCR against *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* and total cell concentrations (log CFU/mL). The results are presented as means of three independents analysis. The correlation between Cq values and CFU/mL were automatically generated through the LC480 Software® 1.5 (Roche Diagnostic GmbH).

All assays were developed with a linear quantitative detection range established by the slope range of 3.3–3.7 cycles/log decade, *r*<sup>2</sup> > 0.997 and an efficiency range of 1.9–2.0. Values below this linear quantitative detection range may be detectable but not quantifiable, as lower limits of quantification are poorly defined.

Measures to avoid carryover DNA were established, such as establishing barrier methods, the use of flow cabin and physical separation of pre- and post-PCR procedures. In spite of this, when NTC was detectable, the limit of detection was established on the last value of the standard curve that holds five cycles of difference with NTC.

Data analyses

An experiment-level analysis was performed for each study parameter (*n* = 9). Shapiro–Wilk goodness-of-fit tests and distribution of data were used to assess normality. Data were expressed as means, SD and 95% confidence interval (95% CI) from the differences.

The primary outcome variable was CFU/mL. Cq values and percentage of vitality were considered as secondary outcomes. Cq values were used to analyse the effect of PMA treatment on the target bacteria detection by qPCR and cell count as CFU per biofilm to test the bacterial quantification on the biofilm.

To test if the standard curves, derived from viable bacteria cultures, were not affected by PMA treatment and to determine whether PMA treatment is capable of distinguishing between viable and dead cells in con-

trol biofilms (not treated with the antimicrobial agent), Student *t*-test for independent samples were used. To compare the effects of the antimicrobial agent at different exposure times on cell vitality in terms of CFU per biofilm with or without the addition of PMA, two-way analysis of variance and *post hoc*-testing with Bonferroni’s correction for multiple comparisons were used.

Results were considered statistically significant at *p* < 0.05. A software package (IBM® SPSS® Statistics 19.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used for all data analysis.

Results

Effect of propidium monoazide treatment on the target bacteria detection by quantitative real-time polymerase chain reaction

Figure 1 represents standard curves obtained from cultures of viable *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* and mixed bacteria cell suspensions treated or not with PMA. Comparing both standard curves, no statistically significant differences in the Cq values across different concentrations were found for *P. gingivalis* (0.04; 95% CI [–9.85, 9.92]; *p* = 0.993), *A. actinomycetemcomitans* (0.01; 95% CI [–9.49, 9.49];

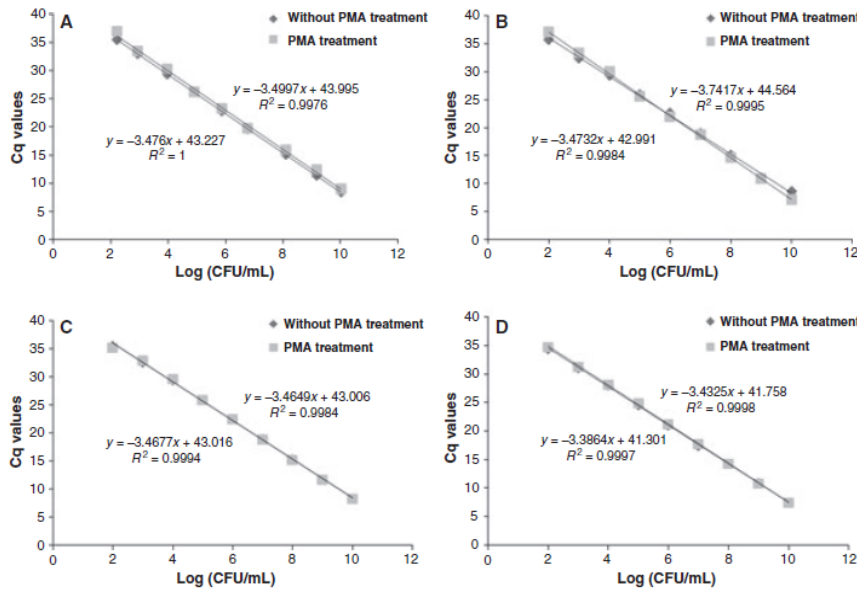


Fig. 1. Standard curves for detection by quantitative real-time polymerase chain reaction of total cells (samples without PMA treatment before DNA extraction) and only viable cells (samples with PMA treatment before DNA extraction) from: (A) total bacteria; (B) *P. gingivalis*; (C) *A. actinomycetemcomitans*; and (D) *F. nucleatum*. Results were from three repeated experiments. PMA, propidium monoazide.

$p = 0.999$ ), *F. nucleatum* (0.18; 95% CI [-9.51, 9.15];  $p = 0.968$ ) and total bacteria cells (0.63; 95% CI [-10.19, 8.94];  $p = 0.891$ ). The linear regression curve demonstrates a similar efficiency in all cases, showing that PMA treatment did not influence the detection range of the qPCR assays. The qPCR standard curves were obtained from three replicated experiments for the quantification of bacteria within the biofilm, with and without PMA. The detection ranges for total bacteria and the three target bacterial species was  $10^2$ – $10^{10}$  CFU/mL, demonstrating a good correlation ( $r^2 > 0.997$ ). The negative controls (NTC) of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and total bacteria yielded a Cq value that determined the limit of detection (Table 2).

**Bacterial quantification within the biofilm by propidium monoazide-quantitative real-time polymerase chain reaction before antimicrobial treatment**

Table 2 depicts the mean and SD of the Cq values obtained from the nine

experiments. In matured biofilms, before PMA treatment, the total bacteria Cq value was 14.0 (SD = 0.7). Based on the qPCR standard curve, the obtained concentration was  $2.8 \times 10^8$  CFU per biofilm (SD =  $1.2 \times 10^8$ ). To distinguish between viable vs. dead cells by qPCR, PMA was used before DNA extraction, and the Cq value increased until 14.6 (SD = 0.5), with a concentration of  $1.7 \times 10^8$  viable CFU per biofilm (SD =  $1.9 \times 10^7$ ) (Table 3). This value represented the concentration of viable cells present in the mature biofilm (60.7%).

The three selected target bacterial species were detected in the biofilm (Table 2) at concentrations of  $2.1 \times 10^7$  CFU for *P. gingivalis*,  $2.4 \times 10^6$  CFU for *A. actinomycetemcomitans*, and  $8.4 \times 10^6$  CFU for *F. nucleatum*, which represented 11.4% of the total cells incorporated in the biofilm (percentage calculated from the values obtained by qPCR on mature biofilms without PMA treatment of the total set of bacteria and the sum of the three target bacteria). The percentage of vitality corresponding to

these bacteria in the mature biofilm was 52.4% for *P. gingivalis*, 54.2% for *A. actinomycetemcomitans*, and 10.0% for *F. nucleatum* (Table 3).

**Effect of isopropyl alcohol on bacterial DNA counts**

In view of the fact that isopropanol can cause destruction of a scarce proportion of the genomic DNA (31), the biofilms, before treatment with PMA, were treated with 70% isopropyl alcohol at 1, 5, 10 or 30 min of exposure and analysed by qPCR; the obtained CFU counts were compared with those obtained from the isopropanol-untreated biofilms. These values varied between the bacterial species (data not shown), but no statistically significant differences were found between the groups at any of the exposure times for the total set of bacteria and *F. nucleatum*. For *A. actinomycetemcomitans*, however, after 30 min of exposure, CFUs per biofilm showed statistically significant differences in the isopropanol-treated biofilms when compared to isopropanol-untreated biofilms. Similarly for *P. gingivalis*, statistically

6 Sánchez et al.

Table 2. Cq values obtained by quantitative real-time polymerase chain reaction from viable total bacteria, *P. gingivalis* (*Pg*), *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) and *F. nucleatum* (*Fn*) in the biofilm, before and after antimicrobial treatment represented by a 70% isopropanol solution

	Cq values [media value <sup>a</sup> (SD)]								
	100 µm Propidium monoazide							No template control	Limit of detection
	Total cells	Viable cells	Time to 70% isopropanol exposure (min)						
1			5	10	30				
Total bacteria	14.0 (0.7)	14.6 (0.5)	22.1 (3.8)	26.1 (0.9)	26.1 (1.0)	27.4 (1.3)	35.1 (1.5)	29.4 (0.9)	
<i>Pg</i>	17.5 (0.4)	18.5 (0.5)	23.8 (4.1)	27.8 (1.7)	28.3 (0.5)	28.9 (2.2)	38.3 (1.5)	32.4 (0.3)	
<i>Aa</i>	21.1 (0.9)	21.9 (0.8)	25.3 (2.4)	27.2 (0.4)	27.3 (0.7)	27.9 (0.4)	35.9 (3.6)	29.4 (0.2)	
<i>Fn</i>	18.0 (0.8)	21.6 (1.2)	29.7 (4.3)	30.9 (2.4)	31.5 (2.7)	33.0 (2.6)	Undeterm <sup>b</sup> .	34.4 (0.1)	

<sup>a</sup>Results were from nine repeated experiments.

<sup>b</sup>Undetermined value: no signal obtained from No template Control.

Table 3. Comparison of the effect of the antimicrobial agent (70% isopropyl alcohol) at different times of exposures on cell vitality of *P. gingivalis* (*Pg*), *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*), *F. nucleatum* (*Fn*) and total set of bacteria in the mature biofilm. All samples were treated with propidium monoazide before DNA extraction. Two-way analysis of variance was used to compare the effect

Bacteria	Exposure to isopropanol (min)	CFU per biofilm Mean (SD) <sup>a</sup>	Difference untreated/treated biofilms <sup>b</sup>		
			Means	95% (CI)	p Value
Total bacteria	Untreated	1.7 × 10 <sup>8</sup> (1.9 × 10 <sup>7</sup> )	–	–	–
	1	6.2 × 10 <sup>6</sup> (3.2 × 10 <sup>6</sup> )	1.7 × 10 <sup>8</sup>	(1.3 × 10 <sup>8</sup> ; 2.1 × 10 <sup>8</sup> )	< 0.001
	5	9.5 × 10 <sup>4</sup> (1.8 × 10 <sup>4</sup> )	1.7 × 10 <sup>8</sup>	(1.4 × 10 <sup>8</sup> ; 2.1 × 10 <sup>8</sup> )	< 0.001
	10	1.0 × 10 <sup>5</sup> (2.3 × 10 <sup>4</sup> )	1.7 × 10 <sup>8</sup>	(1.4 × 10 <sup>8</sup> ; 2.1 × 10 <sup>8</sup> )	< 0.001
	30	4.4 × 10 <sup>4</sup> (8.6 × 10 <sup>3</sup> )	1.7 × 10 <sup>8</sup>	(1.4 × 10 <sup>8</sup> ; 2.1 × 10 <sup>8</sup> )	< 0.001
<i>Pg</i>	Untreated	1.1 × 10 <sup>7</sup> (1.1 × 10 <sup>6</sup> )	–	–	–
	1	1.5 × 10 <sup>6</sup> (6.6 × 10 <sup>5</sup> )	9.7 × 10 <sup>6</sup>	(7.2 × 10 <sup>6</sup> ; 1.2 × 10 <sup>7</sup> )	< 0.001
	5	3.2 × 10 <sup>4</sup> (5.3 × 10 <sup>3</sup> )	1.1 × 10 <sup>7</sup>	(8.6 × 10 <sup>6</sup> ; 1.3 × 10 <sup>7</sup> )	< 0.001
	10	2.1 × 10 <sup>4</sup> (6.4 × 10 <sup>3</sup> )	1.1 × 10 <sup>7</sup>	(8.6 × 10 <sup>6</sup> ; 1.3 × 10 <sup>7</sup> )	< 0.001
	30	1.7 × 10 <sup>4</sup> (2.1 × 10 <sup>3</sup> )	1.1 × 10 <sup>7</sup>	(8.7 × 10 <sup>6</sup> ; 1.3 × 10 <sup>7</sup> )	< 0.001
<i>Aa</i>	Untreated	1.4 × 10 <sup>6</sup> (1.9 × 10 <sup>5</sup> )	–	–	–
	1	3.3 × 10 <sup>5</sup> (1.6 × 10 <sup>5</sup> )	1.0 × 10 <sup>6</sup>	(5.7 × 10 <sup>5</sup> ; 1.5 × 10 <sup>6</sup> )	< 0.001
	5	3.9 × 10 <sup>4</sup> (6.3 × 10 <sup>3</sup> )	1.3 × 10 <sup>6</sup>	(8.6 × 10 <sup>5</sup> ; 1.8 × 10 <sup>6</sup> )	< 0.001
	10	3.7 × 10 <sup>4</sup> (6.3 × 10 <sup>3</sup> )	1.3 × 10 <sup>6</sup>	(8.6 × 10 <sup>5</sup> ; 1.8 × 10 <sup>6</sup> )	< 0.001
	30	2.4 × 10 <sup>4</sup> (2.3 × 10 <sup>3</sup> )	1.3 × 10 <sup>6</sup>	(8.8 × 10 <sup>5</sup> ; 1.8 × 10 <sup>6</sup> )	< 0.001
<i>Fn</i>	Untreated	8.5 × 10 <sup>5</sup> (1.8 × 10 <sup>5</sup> )	–	–	–
	1	3.3 × 10 <sup>4</sup> (2.5 × 10 <sup>4</sup> )	8.1 × 10 <sup>5</sup>	(4.7 × 10 <sup>5</sup> ; 1.2 × 10 <sup>6</sup> )	< 0.001
	5	2.3 × 10 <sup>3</sup> (6.2 × 10 <sup>2</sup> )	8.4 × 10 <sup>5</sup>	(4.9 × 10 <sup>5</sup> ; 1.2 × 10 <sup>6</sup> )	< 0.001
	10	2.4 × 10 <sup>3</sup> (9.6 × 10 <sup>2</sup> )	8.4 × 10 <sup>5</sup>	(4.9 × 10 <sup>5</sup> ; 1.2 × 10 <sup>6</sup> )	< 0.001
	30	1.3 × 10 <sup>3</sup> (9.1 × 10 <sup>2</sup> )	8.5 × 10 <sup>5</sup>	(4.9 × 10 <sup>5</sup> ; 1.2 × 10 <sup>6</sup> )	< 0.001

<sup>a</sup>Effects are shown as the CFU per biofilm obtained by quantitative real-time polymerase chain reaction.

<sup>b</sup>Differences calculated between untreated and treated biofilms with the antimicrobial agent at different times of exposure.

significant differences were found between the isopropanol-untreated biofilms and those treated after 1, 5, 10 or 30 min, but provided suitable DNA template for PCR amplification.

**Bacterial quantification within the biofilm by propidium monoazide-quantitative real-time polymerase chain reaction after the antimicrobial treatment**

When PMA-treated biofilms were exposed to 70% isopropanol for

1 min a statistically significant difference in the number of total bacteria per biofilm was observed, when compared to isopropanol-untreated biofilms (Table 3). A reduction in the total vital cells of 96.4% was observed, with 6.2 × 10<sup>6</sup> (SD = 3.2 × 10<sup>6</sup>) of remaining viable CFUs per biofilm (Table 3). When biofilms were exposed to the antimicrobial solution for periods of 5, 10 and 30 min, Cq values increased (Table 2) and the number of cells reached 9.5 × 10<sup>4</sup> (SD = 1.8 × 10<sup>4</sup>), 1.0 × 10<sup>5</sup> (SD = 2.3 × 10<sup>4</sup>) and

4.4 × 10<sup>4</sup> (SD = 8.6 × 10<sup>3</sup>) CFU per biofilm, respectively (Table 3). No statistically significant changes in CFU per biofilm were found when comparing 5, 10 and 30 min, to 1 min of treatment (data not shown).

Similarly, the effect of different times of isopropanol exposure on the number of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* cells included in the biofilm were analysed by PMA-qPCR. The three target bacteria behaved in a similar manner. The effect of the antimicrobial

solution for 1 min revealed an increase in Cq values for the three bacteria (Table 2), reducing the presence of viable bacteria to  $1.5 \times 10^6$  (SD =  $6.6 \times 10^5$ ),  $3.3 \times 10^5$  (SD =  $1.6 \times 10^5$ ) and  $3.3 \times 10^4$  (SD =  $2.5 \times 10^4$ ) CFUs per biofilm, respectively (Table 3). Statistically significant differences in the number of CFU per biofilm were observed for the three target bacteria when compared to isopropanol-untreated biofilms (Table 3). The reduction in vitality amounted to 86.4% for *P. gingivalis*, 76.4% for *A. actinomycetemcomitans* and 96.0% for *F. nucleatum*. The effect of the antimicrobial solution after 5, 10 and 30 min caused an additional increase in Cq values (Table 2) and a decrease up to  $1.7 \times 10^4$  (SD =  $2.1 \times 10^3$ ),  $2.4 \times 10^4$  (SD =  $2.4 \times 10^3$ ) and  $1.3 \times 10^3$  (SD =  $9.1 \times 10^2$ ) viable CFUs per biofilm for *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum*, respectively (Table 3); the concomitant reduction of cell vitality was 99.8% for *P. gingivalis* and *F. nucleatum*, and 98.3% for *A. actinomycetemcomitans*. When comparing 5, 10 and 30 min of isopropanol exposure to isopropanol-untreated biofilms, further statistically significant differences in the number of CFUs per biofilm were observed. No statistically significant changes in CFU per biofilm, however, were found when comparing 5, 10 and 30 min, vs. 1 min of isopropanol exposure (data not shown).

## Discussion

These results have confirmed the efficacy and applicability of the proposed PMA-based live-dead method, when combined with qPCR, for assessing the bacterial viability within the biofilm and thus discriminating the DNA counts from viable vs. dead cells once the biofilm has been exposed to an antimicrobial agent. This method was targeted, not only to evaluate the antibacterial impact on the total amount of bacteria, but also to specific bacterial pathogens, such as to bacteria strongly associated with periodontitis (*P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*), or to opportu-

nistic pathogens such as *F. nucleatum*, which play an important role in biofilm development building the scaffold between the early colonizers and the true oral pathogens.

As there is scarce information on the use of cultured-independent molecular methods to assess the effect of antiseptic agents on dental biofilms, this study provides evidence of the efficacy of a PCR-based method able to accurately detect and quantify only viable bacteria after the antimicrobial treatment. There are rapid methods, such as the direct evaluation of biofilms under the microscope with the use of specific staining that are able to discriminate between viable/dead bacteria, but this method does not provide sufficient specificity or sensitivity. On the contrary, culture-based methods may be highly specific, but are slow, require higher detection limits and heavily rely on the operator technical skills. In this context, this PMA-qPCR methodology has shown not only high sensitivity and specificity, but also sufficient speed for detecting antimicrobial efficacy when a well known antibacterial agent is used.

This PMA-qPCR method was tested previously in our laboratory on pure monoculture planktonic models of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* and showed a successful differentiation between DNA from viable and dead cells (40). Owing to the intrinsic characteristics of each microorganism and the possible differences in requirements for assay conditions (time and temperature of incubation, time to exposure to light source, amplification efficiency of the qPCR assay, etc.), the methodology and conditions were tested with each target bacteria included in the biofilm model, with a successful differentiation between viable and dead cells (data not shown).

For evaluation of this methodology as a tool to assess the effects of antimicrobial agents on an *in vitro* biofilm system, 70% isopropyl alcohol solution in water was selected due to its proven efficacy against a wide spectrum of bacteria. This alcohol kills bacteria by solubilizing lipids in the

cell membrane until it loses its structural integrity. As the cell membrane disintegrates the alcohol gains access to the cytoplasm and causes denaturation of the proteins within the bacteria. The choice of a 70% dilution was based on the fact that alcohols are most effective when combined with purified water to facilitate their cell membrane diffusion.

First, we evaluated the effect of PMA treatment on the qPCR-based detection of total viable bacteria cells, as well as the specific pathogens *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum*. In all cases, there were no statistically significant differences in Cq values across the different concentrations; Moreover, the ranges of bacterial detection were not influenced by the addition of PMA. It demonstrates that PMA treatment before DNA extraction had no effect on the detection of viable target bacteria by qPCR. These results were in agreement with those reported in similar assays with bacteria from different microenvironments (30–37), including oral bacteria (38–40), demonstrating the highly selective ability of PMA of penetrating only in dead cells. This PMA treatment, however, had no influence in the efficiency of the qPCR, which has also been similarly reported in other investigations reporting that the addition of PMA did not influence the qPCR signal (26,30,41,42).

When matured biofilms were evaluated by qPCR, the bacterial concentration obtained was  $2.8 \times 10^8$  CFU per biofilm (SD =  $1.2 \times 10^8$ ). After the treatment of these biofilms with 100  $\mu$ M PMA, it was shown that only  $1.7 \times 10^8$  CFU per biofilm (SD =  $1.9 \times 10^7$ ) were viable cells (60.7% of vitality). These results are in accordance with other studies reporting that the number of viable bacteria is reduced with the ageing of the biofilm. A young biofilm harbours about 80% of viable bacterial cells, while a mature biofilm has approximately 50% (43). In addition, using the same biofilm model and evaluating the mature biofilms by confocal laser scanning microscopy with the BacLight™ staining kit, similar percentages of vitality were reported (14).

Once confirmed that PMA had no influence on the ability of qPCR to detect and quantify viable target bacteria, the PMA-qPCR method was used to measure the number of live and dead bacteria present in isopropanol-treated biofilms and to compare these results with control biofilms not treated with the alcohol. Also in agreement with previous reports (26,30–40), PMA showed its ability to distinguish between viable and dead bacterial cells in complex samples, by inhibiting the DNA amplification from dead cells, once the biofilm was exposed at different times with this antimicrobial agent. This method was capable of quantifying a progressive decrease in the number of viable target bacteria within the biofilm with increasing exposure time of the antimicrobial agent, without being affected by the presence of large numbers of dead cells.

The exposure of this mature biofilm to a 1 min contact with 70% isopropanol solution resulted in a clear bactericidal effect (96.4% of cell death), with a statistically significant reduction in the total viable microbial load when compared to isopropanol-untreated biofilms. Similar results were for the target species, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum*. When isopropanol exposure times were increased, the cellular vitality continued its decrease, although at 5 min statistically significant differences were demonstrated only for the total bacterial load, but not for *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum*. After 30 min of isopropanol exposure, there was a decrease in Cq values, which can be associated to the destruction of a scarce proportion of genomic DNA. These results confirm that bacteria in matured biofilms are less susceptible to antimicrobial agents due to several physical and biological factors that protect the bacteria when living in communities and therefore, require longer exposure times to obtain higher antimicrobial effects (1,15,16).

It is noteworthy that, while the vitality reduction within the biofilm

for the total set of bacteria was 4 log<sub>10</sub>, for *P. gingivalis* was 3 log<sub>10</sub> and for *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* was 2 log<sub>10</sub> (Table 3). As discussed above, these pathogens represented 11.4% of the total cells in the mature biofilm, and 7.4% of the viable cells. After the 5 min exposure to the antimicrobial agent, these target bacteria represented 77.2% of vital cells into the biofilm, which may suggest that these pathogenic bacteria, in particular, *A. actinomycetemcomitans*, have developed mechanisms of resistance not present in other less pathogenic bacteria included in this biofilm model, such as *S. oralis* or *V. parvula* [more abundant in the 72 h biofilm than the target pathogens (14)] and *A. naeslundii*, which together accounted for 92.6% of the viable cells in the mature biofilm.

In summary, the results from this investigation have demonstrated that the PMA-qPCR method improves the qPCR technique, as it allows the rapid and accurate quantitative evaluation of vital bacterial cells in an oral biofilm after being exposed to an antimicrobial solution. Using this method, the number of viable *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* as well as total bacteria was measured irrespective of the presence of dead bacterial cells. As PMA does not disturb the detection range of the qPCR technique, this combined method has shown to be suitable for evaluating the number of live cells after an antimicrobial treatment. The additional advantages of PCR-based techniques over traditional culture techniques of being highly specific, sensitive and able to obtain results more rapidly make this microbial diagnostic technique suitable for use in clinical samples.

#### Acknowledgements

The study was supported by means of a CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) Research Project with the Ministry of Science and Innovation and the company DENTAID, SA (Project: ART 83 LOU. DENTAID 332/2011).

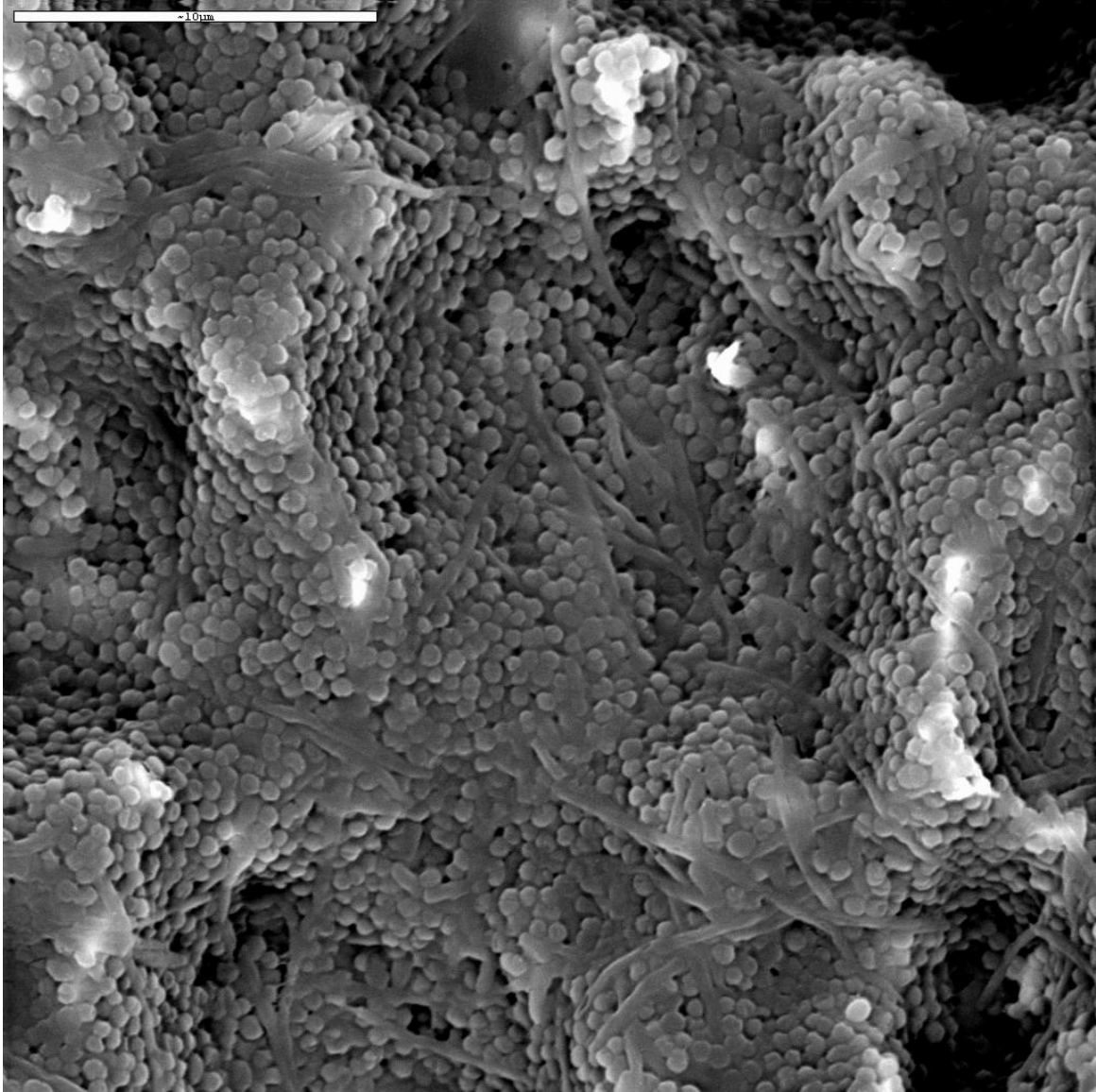
#### References

1. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 2010;**89**:8–18.
2. Claydon NC. Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning. *Periodontol 2000* 2008;**48**:10–22.
3. Hu D, Li X, Sreenivasan PK, DeVizio W. A randomized, double-blind clinical study to assess the antimicrobial effects of a cetylpyridinium chloride mouth rinse on dental plaque bacteria. *Clin Ther* 2009;**31**:2540–2548.
4. Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res* 2009;**23** (suppl 1):S39–S48.
5. Barnett ML. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 2006;**137**(suppl):16S–21S.
6. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent* 2010;**38**(suppl 1):S6–S10.
7. Wimpenny J. Laboratory models of biofilm. In: Heman HN, Wilson N, ed. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*. Cardiff, UK: Bioline, 1999:89–110.
8. Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001;**80**:363–370.
9. Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 2002;**36**:93–100.
10. Foster JS, Pan PC, Kolenbrander PE. Effects of antimicrobial agents on oral biofilms in a saliva-conditioned flowcell. *Biofilms* 2004;**1**:5–12.
11. Hope CK, Wilson M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods* 2006;**66**:390–398.
12. Walker C, Sedlacek MJ. An *in vitro* biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2007;**22**:152–161.
13. Tamura A, Ara T, Imamura Y, Fujii T, Wang PL. The effects of antibiotics on *in vitro* biofilm model of periodontal disease. *Eur J Med Res* 2008;**13**:439–445.
14. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, Leon R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontol Res* 2011;**46**:252–260.
15. Fine DH, Furgang D, Barnett ML. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:697–700.

16. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;**2**:114–122.
17. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004;**31**:1034–1047.
18. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y. Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:3827–3830.
19. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:2015–2021.
20. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2007;**78**:79–86.
21. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandembroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:4950–4954.
22. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandembroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;**45**:191–199.
23. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandembroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006;**33**:427–433.
24. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR *et al*. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:1407–1417.
25. Teles FR, Teles RP, Uzel NG *et al*. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodontol Res* 2011;**47**:95–104.
26. Nocker A, Camper AK. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett* 2009;**291**:137–142.
27. Park SN, Park JY, Kook JK. Development of *Porphyromonas gingivalis*-specific quantitative real-time PCR primers based on the nucleotide sequence of rpoB. *J Microbiol* 2011;**49**:315–319.
28. Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 2003;**34**:804–808, 810, 812–803.
29. Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, Holck AL. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:1018–1024.
30. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 2006;**67**:310–320.
31. Cawthorn DM, Withuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol* 2008;**105**:1178–1185.
32. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AK. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:5111–5117.
33. Pan Y, Breidt F Jr. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:8028–8031.
34. Lee JL, Levin RE. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *J Microbiol Methods* 2009;**76**:93–96.
35. Kramer M, Obermajer N, Bogovic Matijasic B, Rogelj I, Kmetec V. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;**84**:1137–1147.
36. Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn J Infect Dis* 2010;**63**:119–123.
37. Nam S, Kwon S, Kim MJ *et al*. Selective detection of viable *Helicobacter pylori* using ethidium monoazide or propidium monoazide in combination with real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 2011;**55**:841–846.
38. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. *Mol Oral Microbiol* 2011;**26**:253–261.
39. Takahashi Y, Yoshida A, Nagayoshi M *et al*. Enumeration of viable *Enterococcus faecalis*, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 2011;**55**:889–892.
40. Sanchez MC, Marin MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, Herrera D, Sanz M. Analysis of viable vs. dead *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* using selective quantitative real-time PCR with propidium monoazide. *J Periodontol Res* 2012. doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01522.x
41. Hein I, Schneeweiss W, Stanek C, Wagner M. Ethidium monoazide and propidium monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal real-time PCR. *J Microbiol Methods* 2007;**71**:336–339.
42. Soejima T, Iida K, Qin T, Taniai H, Seki M, Yoshida S. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:2305–2313.
43. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;**13**:20–26.
44. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002;**148**:257–266.



# DISCUSIÓN





“*E pluribus unum*”, de la pluralidad la unidad. Hablamos de los “biofilms” o biopelículas, comunidades estructuradas de microorganismos y forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La biopelícula oral constituye una compleja comunidad donde todos sus miembros se encuentran interconectados para actuar como uno solo, con importantes repercusiones en la salud humana (Zamora, 2009).

En el presente trabajo, y dada la naturaleza compleja y variable de la placa dental, se ha desarrollado y validado un modelo de biopelícula oral *in vitro*, reproducible y sencillo de manejar, que representa la microbiota más característica de la placa subgingival, y que exhibe patrones de colonización y maduración similares a los que acontecen *in vivo*. Además, y con el fin de aplicarlo en la evaluación inicial de nuevas estrategias terapéuticas, previo a su evaluación *in vivo*, así como en estudios comparativos sin necesidad de pacientes, hemos puesto a punto varias técnicas basadas en biología molecular, e independientes de cultivo, que nos permitirán testar el efecto de los productos antisépticos frente a las principales bacterias periodontopatógenas, así como al total de las bacterias, que constituyen la biopelícula.

La composición bacteriana de la biopelícula oral ha sido estudiada en detalle utilizando numerosas técnicas, cada vez más sofisticadas, tanto en estado de salud como en situación de enfermedad (Smith y col., 1989; Ximenez-Fyvie y col., 2000; Socransky y col., 2004; Aas y col., 2005; Rasiah y col., 2005; Paster y col., 2006; Ledder y col., 2007; Keijser y col., 2008; Zaura y col., 2009; Kolenbrander y col., 2010; Dewhirst y col., 2010). Sin embargo, no son muchos los estudios que abordan su estructura, dinámica o determinantes ecológicos que marcan pautas en su formación y desarrollo, incrementándose la publicación de estudios sobre estos puntos clave poco a poco, junto con aquellos trabajos que abordan la respuesta de estas bacterias en biopelícula a los tratamientos antisépticos o frente a inhibidores de su formación (Zaura-Ariete y col., 2001; Shapiro y col., 2002; Foster y col., 2004;

Hope y col., 2004; Takenaka y col., 2008; Zijngel y col., 2010; Sliepen y col., 2010; Corbin y col., 2011; Schalafer y col., 2012; Xiao y col., 2012; Astasov-Frauenhoffer y col., 2013; Do y col., 2013; Belibasakis y Thurnheer, 2013). Esto se debe, en gran medida, a la inherente heterogeneidad de esta comunidad, que puede abarcar hasta 200 especies diferentes conviviendo en un individuo sano (Kolenbrander y col., 2010; Dewhirst y col., 2010; Filoche y col., 2010), a la complejidad estructural que adquieren, o al gran número de interacciones que tienen lugar entre las bacterias que conviven en ellas, sumado a las consideraciones éticas asociadas con el estudio microbiológico *in vivo* en pacientes con enfermedades periodontales o caries dental.

### **1. DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE BIOPELÍCULA ORAL *IN VITRO*. ESTRUCTURA DE LA BIOPELÍCULA, VITALIDAD BACTERIANA Y CINÉTICA DE INCORPORACIÓN**

Son pocos los modelos *in vitro* de biopelículas descritos en la literatura científica, y es que su desarrollo no está exento de dificultades. Stoodley y colaboradores (2004) atribuyen gran parte del retraso en el estudio de las biopelículas a la dificultad de trabajar con estas poblaciones heterogéneas en comparación con los estudios, que se venía realizando de poblaciones planctónicas homogéneas. En un artículo de 2004, en *Nature Reviews*, Stoodley y colaboradores describen muchas de las razones por las que las biopelículas son extremadamente difíciles de estudiar *in vitro*, tales como el hecho de que la difusión de líquido a través de una biopelícula y las fuerzas de fluido que actúan sobre la misma han de ser cuidadosamente calculadas si se quiere trabajar correctamente. Según Stoodley y colaboradores, la necesidad de dominar estas técnicas de laboratorio ha disuadido a muchos científicos de trabajar con biopelículas *in vitro*.

En el caso de la microbiología oral, en las últimas décadas, se han llevado a cabo estudios *in vivo* utilizando férulas parciales que se insertan en pacientes

(Netuschil y col., 1998; Wecke y col., 2000; Auschill y col., 2001; Takeuchi y col., 2004, Díaz y col., 2006; Dige y col., 2009). Igualmente, se han venido desarrollando modelos de biopelícula oral *in vitro* principalmente enfocados a representar la placa supragingival, bien utilizando la placa dental de pacientes como inoculo o consorcios definidos de especies bacterianas, tanto en sistemas estáticos como dinámicos (Pratten y col., 2000; Guggenheim y col., 2001; Eick y col., 2004; Foster y col., 2004). Sin embargo, son pocos los modelos descritos que permitan estudiar la estructura, formación y desarrollo de la placa subgingival, así como el efecto de tratamientos antisépticos sobre las bacterias incluidas en ellos (Kuramitsu y col., 2005; Hope y Wilson, 2006; Walker y Sedlacek, 2007; Tamura y col., 2008; Periasamy y Kolenbrander, 2009; Amman y col., 2012).

El modelo *in vitro* de biopelícula subgingival que proponemos en este trabajo de investigación subsana algunas de las dificultades detalladas, y cumple con las premisas propuestas como objetivos principales, ya que es un modelo de biopelícula subgingival *in vitro* reproducible y sencillo de manejar, y que nos permite:

- 1.1 controlar las condiciones ambientales como aporte de nutrientes, pH, condiciones de anaerobiosis o temperatura;
- 1.2 trabajar con un consorcio definido de especies bacterianas;
- 1.3 evaluar el desarrollo de esta comunidad, haciendo un seguimiento de su evolución a lo largo de todas sus fases de desarrollo, desde los primeros pasos de colonización hasta que alcanza la madurez.

### **1.1 Control de las condiciones ambientales como aporte de nutrientes, pH, condiciones de anaerobiosis o temperatura**

En primer lugar, el modelo de biopelícula desarrollado permite controlar las condiciones ambientales más relevantes para la formación de la biopelícula oral,

como es el aporte de nutrientes. Un punto crítico al trabajar con biopelículas orales es obtener un crecimiento reproducible de los microorganismos implicados, siendo el aporte de nutrientes un factor clave que afectará a la coagregación intra- e inter-especies (unión de dos microorganismos en suspensión que se produce por medio de interacciones específicas entre componentes de las superficies respectivas de las células) (Guggenheim y col., 2001). Para favorecer el crecimiento óptimo de las seis bacterias seleccionadas y facilitar su convivencia en la biopelícula, hemos utilizado un medio de cultivo con un alto contenido en proteínas, principalmente mucina, reproduciendo la fuente de carbono y energía disponibles para las bacterias en la cavidad oral (Marsh y col., 2011). Además, se ha incluido ácido glutámico, uno de los aminoácidos no esenciales más abundantes en la naturaleza, que favorecerá el crecimiento de *F. nucleatum*, algo que ha resultado complicado de conseguir para otros autores en sus modelos de biopelículas *in vitro* (Schmidlin y col., 2013), y los factores de crecimiento hemina y menadiona. La hemina, producto de la descomposición de la hemoglobina, y la vitamina K3 o menadiona, considerada como una de las provitaminas fundamentales, son factores relevantes para el crecimiento de la bacteria *P. gingivalis*, tanto *in vivo* como *in vitro* (Holt y col., 1994; Koneman y col., 1999; Bartelt, 2000).

Por ende, el modelo descrito nos va a permitir controlar las condiciones de anaerobiosis, de temperatura y de pH, que serán siempre las mismas inter- e intra-experimentos.

Las condiciones experimentales del modelo desarrollado también incluyen un sistema discontinuo o estático de flujo en placas de cultivo, buscando minimizar las fuerzas de dispersión que actúan sobre la biopelícula y las complicaciones derivadas de la difusión de líquido a través de ella (Guggenheim y col., 2001; Stoodley y col., 2004). Recientemente, con el ánimo de mejorar la reproducibilidad del modelo respecto a la dinámica de fluidos que se producen *in vivo*, se ha validado el modelo en un sistema de flujo continuo en colaboración con otro

equipo de investigación (Dentaid, Barcelona, España) (Blanc y col., 2013). No se han observado diferencias significativas en la vitalidad bacteriana de las biopelículas maduras obtenidas por ambos sistemas, dinámico y estático (Tabla 3). Sin embargo, sí que se observan diferencias en cuanto a la altura alcanzada entre las biopelículas maduras desarrolladas por los dos sistemas, que, entre otras causas podría deberse al mecanismo porta-muestras que posee el microscopio confocal utilizado para su medición en cada caso (en nuestro caso, el modelo de biopelícula estática, el mecanismo portamuestras es un sistema invertido, donde se podría oprimir ligeramente la estructura de la biopelícula generada por el propio peso del disco de hidroxiapatita).

**Tabla 3.** Comparación de la vitalidad bacteriana y de la altura alcanzada de una biopelícula madura desarrollada siguiendo las mismas pautas experimentales pero en dos modelos de flujo: estático y dinámico. Los datos se presentan como media y desviación estándar.

	Modelo estático	Modelo dinámico
Vitalidad (%)	60,7 (9,5)	50,5 (10,5)
Altura (µm)	35,1 (16,9)	52,7 (3,9)

En cuanto al número de bacterias incorporadas en las biopelículas maduras, tanto en el sistema estático como en el dinámico, se observa la presencia de las 6 bacterias utilizadas a concentraciones muy similares y en órdenes de magnitud adecuados para trabajar con ellas (Tabla 4). El número total de bacterias obtenido por ambos sistemas coincide con lo descrito *in vivo*, del orden de  $10^3$ - $10^8$  bacterias para la biopelícula subgingival por diente (Socransky y Haffajee, 2009).

Por lo tanto, consideramos que el modelo estático presentado aquí es válido en cuanto a condiciones de crecimiento y desarrollo de una biopelícula oral representativa de la microbiota subgingival *in vivo*.

**Tabla 4.** Número de bacterias (bacterias/biopelícula) en una biopelícula madura desarrollada siguiendo las mismas pautas experimentales pero en dos modelos de flujo: estático y dinámico. Los datos se presentan como media y desviación estándar.

	Modelo estático	Modelo dinámico
<b>So</b>	1,2x10 <sup>7</sup> (5,5x10 <sup>6</sup> )	3,6x10 <sup>7</sup> (1,0x10 <sup>7</sup> )
<b>An</b>	9,4x10 <sup>6</sup> (2,0x10 <sup>6</sup> )	3,1x10 <sup>6</sup> (1,6x10 <sup>6</sup> )
<b>Vp</b>	1,5x10 <sup>8</sup> (2,5x10 <sup>7</sup> )	1,9x10 <sup>8</sup> (6,0x10 <sup>7</sup> )
<b>Fn</b>	1,3x10 <sup>7</sup> (1,5x10 <sup>6</sup> )	3,4x10 <sup>7</sup> (1,0x10 <sup>7</sup> )
<b>Pg</b>	2,6x10 <sup>6</sup> (1,2x10 <sup>6</sup> )	4,9x10 <sup>8</sup> (1,1x10 <sup>8</sup> )
<b>Aa</b>	2,4x10 <sup>7</sup> (4,9x10 <sup>6</sup> )	1,2x10 <sup>7</sup> (5,8x10 <sup>6</sup> )

*So, S. oralis; An, A. naeslundii; Vp, V. parvula; Fn, F. nucleatum; Pg, P. gingivalis; Aa, A. actinomycetemcomitans*

## 1.2 Consorcio definido de especies bacterianas

En segundo lugar, el modelo experimental desarrollado nos permite determinar la composición bacteriana que lo constituye, a diferencia de trabajar con placa dental de pacientes como inóculo o con férulas parciales, donde si bien la composición bacteriana será más diversa, la variabilidad de la misma presumiblemente será muy alta entre experimentos llevados a cabo en diferentes días. Las especies seleccionadas para este modelo experimental son las que frecuentemente se localizan en la placa subgingival (Ximenez-Fyvie y col., 2000; Paster y col., 2006; Ledder y col., 2007) e incluye colonizadores primarios (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*), pertenecientes a los diferentes clústeres o complejos descritos por Socransky y colaboradores (1998).

---

### 1.3 Evaluación de la evolución a lo largo de todas sus fases de desarrollo de la biopelícula, desde los primeros pasos de colonización hasta la madurez

En tercer lugar, el modelo de biopelícula oral *in vitro* desarrollado nos permite evaluar la evolución de esta comunidad, permitiendo el seguimiento de dicha evolución a lo largo de todas sus fases de formación, desde los primeros pasos de colonización hasta que alcanza la madurez. Como ya hemos detallado, los procesos de colonización y desarrollo en la biopelícula oral consisten en una sucesión microbiana repetible que depende de las interacciones entre los organismos, y entre los organismos y su medio ambiente, lo que indica que la interacción no es aleatoria (Kolenbrander y col., 2010).

Numerosos estudios *in vivo* han demostrado que miembros de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces* destacan como colonizadores iniciales predominantes en el origen de una biopelícula oral, y cómo el fenómeno de coagregación entre estas especies colonizadoras y otras bacterias específicas, como son las del género *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Aggregatibacter* o *Porphyromonas*, juega un papel fundamental en el proceso de maduración de estas comunidades (Kolenbrander y col., 2010). Kolenbrander y colaboradores (2010) proponen que estos colonizadores iniciales, *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp., poseen un conjunto de características que están bien adaptadas para la formación de la comunidad, y que estas comunidades iniciales son las piedras angulares del nuevo crecimiento de la biopelícula oral después de cada procedimiento de higiene. Así, por ejemplo, los estreptococos reconocen la mayoría de los receptores en la película adquirida que recubre el esmalte dental inmediatamente después de limpiar la superficie, tales como estaterina, proteínas ricas en prolina,  $\alpha$ -amilasa salival, mucinas sialiladas y aglutinina salival. *Actinomyces* spp. se une a las proteínas ricas en prolina y estaterina, una proteína que contiene fosfato. Sin embargo, las fusobacterias pueden unirse a la estaterina pero no a las proteínas ricas en prolina. En nuestro modelo de biopelícula *in vitro* se cumple la secuencia de incorporación

descrita anteriormente, y es que en las primeras horas de formación *in situ*, se puede observar, por la técnica de T-RFLP, como las bacterias predominantes son *S. oralis*, *A. naeslundii* y *V. parvula*.

*In vivo*, las bacterias del género *Fusobacterium* exhiben más asociaciones que cualquier otro género. Debido a que las cepas de *F. nucleatum* coagregan con colonizadores iniciales, secundarios y tardíos, Kolenbrander y colaboradores (2010) sugieren que este género se comporta como bacteria "puente" en la sucesión de los géneros en el desarrollo de la placa dental de forma natural. En nuestro modelo *in vitro* de biopelícula, queda patente como la presencia de esta bacteria precede a la aparición de los colonizadores tardíos, representados por *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

De acuerdo con lo publicado por otros autores, nuestro modelo presenta una disposición estructural representativa de la placa dental (Netuschil y col., 1998; Pratten y col., 2000; Ausschill y col., 2001; Hope y col., 2006; Dige y col., 2009) y corrobora lo postulado por Branda y colaboradores (2005), que afirman que las biopelículas maduras presentan tan solo alrededor del 50% de sus células vivas.

## **2. APLICACIÓN DE TÉCNICAS METODOLÓGICAS BASADAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR, E INDEPENDIENTES DE CULTIVO, PARA EVALUAR LA ACCIÓN DE AGENTES ANTIBACTERIANOS EN EL MODELO DE BIOPELÍCULA *IN VITRO***

Combatir la formación de la biopelícula oral es una de las medidas más efectivas para la prevención de las enfermedades bucales más prevalentes. Está comprobado, por ejemplo, que una correcta higiene oral con el adecuado control de la placa dental limitará la acumulación de biopelícula, previniendo o revertiendo el estado inflamatorio de los tejidos gingivales (Gunsolley y col., 2006; Barnett y col., 2006; Teles y col., 2009). Sin embargo, los datos epidemiológicos indican que la mayoría de las personas no controlan adecuadamente la

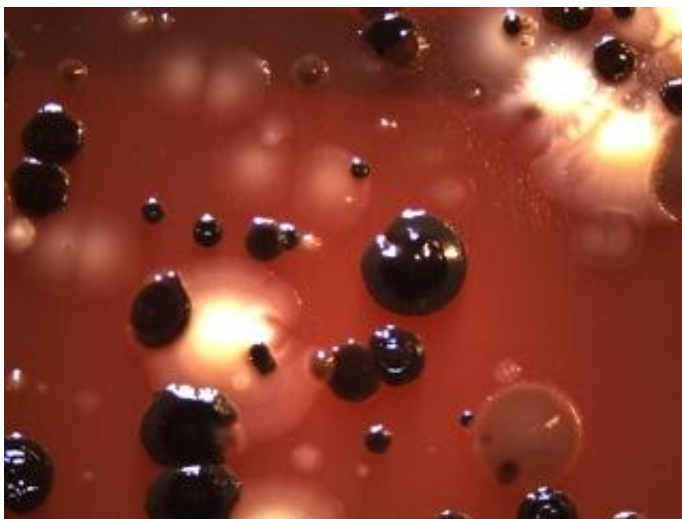
acumulación de placa y la gingivitis sigue siendo una enfermedad muy prevalente (Sheiham y col., 2000; Teles y col., 2009;).

Esta falta de control se achaca principalmente a la falta de motivación o de destreza por parte del paciente (Teles y col., 2009). Pero hay que tener en cuenta que la mayoría de los productos antibacterianos presentes en el mercado, ya sean formulados como productos de higiene cotidiana o como antimicrobianos, han sido testados frente a bacterias planctónicas y no frente a biopelículas microbianas, el estado natural de las bacterias patógenas orales. Por ejemplo, y como ya hemos mencionado, las bacterias pueden ser hasta mil veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en estado planctónico (Fine y col., 2001; Zaura-Arite y col., 2001; Davies, 2003; Filoche y col., 2010), posiblemente por varias de las razones que se han argumentado, como la baja o incompleta penetración del antibiótico en la biopelícula, la expresión de genes de confieren resistencia a dicho antibiótico, la baja tasa de crecimiento de las bacterias sésiles, etc. Así mismo, los ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos (antibiogramas) que se realizan rutinariamente en la clínica están diseñados para medir la susceptibilidad frente al producto de la bacteria crecida de forma planctónica, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no ser extrapolables a esa misma bacteria cuando está creciendo en el interior de una biopelícula.

Por ello, los modelos de biopelícula *in vitro* se van a convertir en herramientas útiles para llevar a cabo, por ejemplo, estudios que comparen la concentración mínima inhibitoria (CMI) o concentración bactericida mínima (CMB) de agentes antimicrobianos en bacterias planctónicas y sésiles, para estudiar el efecto de dichos agentes antimicrobianos sobre las bacterias periodontopatógenas en biopelícula, para la evaluación inicial de la eficacia de nuevos tratamientos antisépticos frente a las bacterias en tal situación, en biopelícula, o bien para llevar a cabo estudios comparativos de eficacias antibacterianas sin necesidad de llevarlos a cabo con pacientes (Zaura-Ariete y col., 2001; Shapiro y col., 2002; Nori y col., 2003; Foster y col., 2004; Hope y col., 2004;

Takenaka y col., 2008; Sliepen y col., 2010; Corbin y col., 2011; Schalafer y col., 2012; Astasov-Frauenhoffer y col., 2013; Blanc y col., 2013; Belibasakis y Thurnheer, 2013).

Los esfuerzos científicos están dando lugar al desarrollo de nuevos métodos basados en técnicas de cultivo y/o moleculares para cuantificar bacterias viables, por ende potencialmente patogénicas, tanto en muestras procedentes de pacientes afectados de enfermedad como en aquellas procedentes de modelos *in vitro*. La detección, identificación y cuantificación de bacterias en muestras orales mediante la técnica de cultivo es la metodología de diagnóstico de referencia. Presenta una gran ventaja, y es que el diagnóstico se basa en la cuantificación de las bacterias viables y, por tanto, metabólicamente activas, presentes en la muestra recogida. Sin embargo, esta técnica tiene algunas desventajas, como los procedimientos laboriosos que requiere, con tiempos muy largos de incubación, que en el caso de algunas bacterias como *T. forsythia* es de 14 días, la necesidad de medios de cultivo específicos para grupos de bacterias, la maestría en la identificación morfológica de las colonias, etc. (Breeuwer y col., 2000) (Figura 20).



**Figura 20.** Detalle de una placa de medio agar sangre con unidades formadoras de colonias de diferentes géneros bacterianos procedentes de una muestra de fluido crevicular.

---

Las técnicas de diagnóstico basadas en biología molecular solventan algunos de los inconvenientes de las técnicas de cultivo, y es que son más sensibles, precisas y rápidas. En los últimos años, se han venido aplicando diferentes técnicas basadas en biología molecular en la identificación de la microbiota que habita la cavidad bucal, incrementándose el número de especies bacterianas detectadas a medida que avanza la tecnología (Smith y col., 1989; Ximenez-Fyvie y col., 2000; Socransky y col., 2004; Aas y col., 2005; Rasiah y col., 2005; Paster y col., 2006; Ledder y col., 2007; Keijser y col., 2008; Zaura y col., 2009; Kolenbrander y col., 2010; Dewhirst y col., 2010) así como para la identificación y cuantificación de patógenos subgingivales en muestras orales (Boutaga y col., 2003, 2005, 2006 y 2007; Sanz y col., 2004; Suzuki y col., 2004; Preza y col., 2008; Aas y col., 2008; Nocker y col., 2009; Teles y col., 2011; Park y col., 2011). Pero son menos las aplicaciones de las mismas para estudiar la eficacia de los tratamientos antisépticos en estas comunidades multi-microbianas.

En el presente trabajo, y con el fin de optimizar el estudio del efecto de productos antimicrobianos basados en la reducción de la vitalidad y/o presencia de las bacterias en las biopelícula orales, y en un futuro poder validarlos como pruebas rápidas de diagnóstico en pacientes para el seguimiento de los tratamientos periodontales, se han puesto a punto dos técnicas moleculares independiente de cultivo.

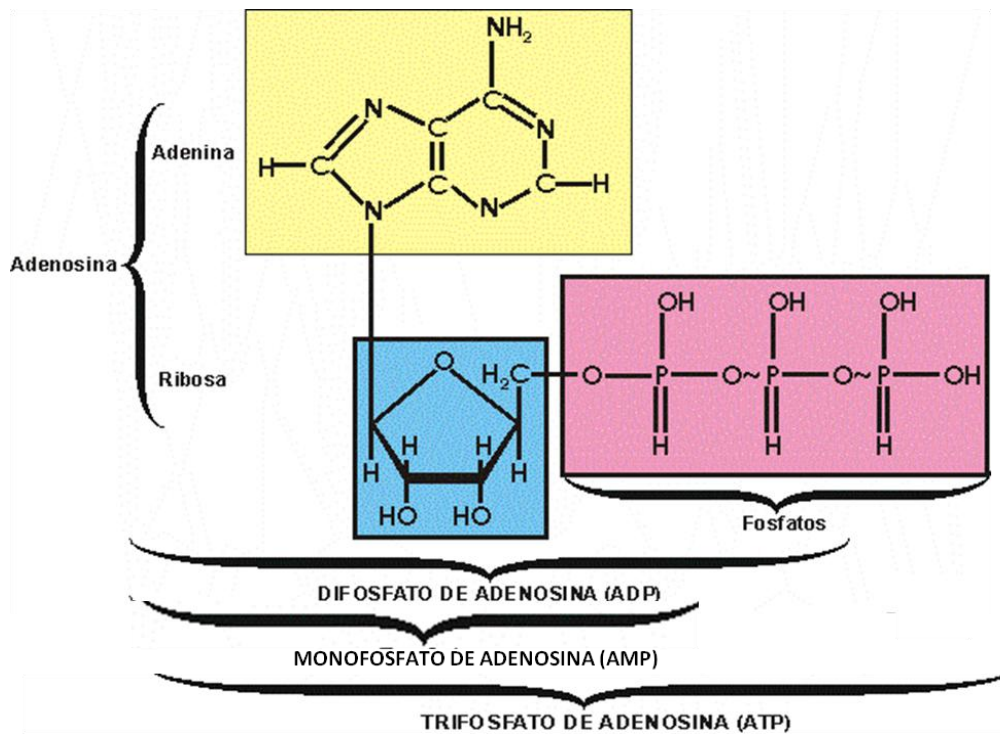
### **2.1. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA VITALIDAD BACTERIANA BASADO EN LA BIOLUMINISCENCIA PROCEDENTE DE LA MOLÉCULA ADENOSIN TRIFOSFATO (ATP).**

Una primera alternativa que proponemos es el método de ATP-bioluminiscencia, que se viene aplicando con éxito como herramienta de cuantificación para evaluar la vitalidad bacteriana en diferentes muestras biológicas (Chen y col., 1994; Arakawa y col., 2004; Schwarz y col., 2005; Pellegrini y col., 2009; Pan y col., 2010). Previamente a nuestro estudio, varios autores demostraron la correlación entre las medidas de ATP y el número de células

viabiles obtenidas por técnicas de cultivo estándar para la determinación de bacterias orales totales (Gallez y col., 2000; Pellegrini y col., 2009; Fazilat y col., 2010). Sin embargo, hasta el momento, este método no había sido aplicado en un modelo de biopelícula oral *in vitro* representativo de la microbiota subgingival con el fin de testar la respuesta de las bacterias incluidas en el mismo a compuestos antisépticos.

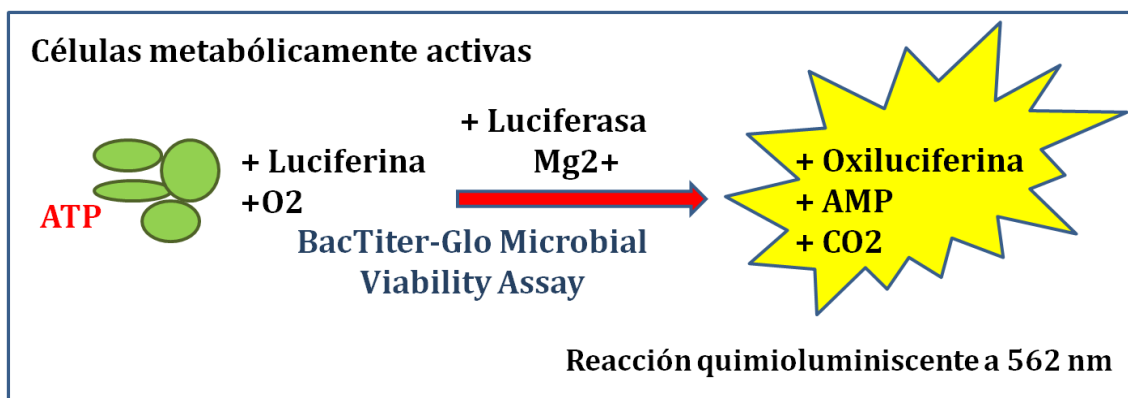
La bioluminiscencia es una tecnología basada en la detección de la molécula adenosin trifosfato (ATP). Fue primeramente introducida por la NASA en 1960 como una posible medida para detectar vida en otros planetas y como medida preventiva de contaminación en el agua reciclada durante largos viajes al espacio. La bioluminiscencia es un fenómeno natural que ocurre en muchas algas y bacterias acuáticas, así como en la luz producida por las luciérnagas, que es de donde ha evolucionado esta tecnología. Las luciérnagas poseen una enzima llamada Luciferasa, que cataliza la oxidación de un sustrato, la luciferina, usando ATP-Mg<sup>2+</sup> como donador de electrones, produciendo luz.

La técnica se basa en la actividad del nucleótido ATP como elemento clave en el intercambio de energía de todos los sistemas biológicos, interviniendo tanto en procesos catabólicos como anabólicos; el ATP sirve como principal donador de energía y está presente en todas las células metabólicamente activas. Es un nucleótido constituido por una adenina, una ribosa y una unidad trifosfato (Figura 21). Constituye una molécula rica en energía debido a que su unidad trifosfato contiene dos enlaces fosfoanhídridos. Se libera una gran cantidad de energía cuando el ATP se hidroliza a adenosin difosfato (ADP) y ortofosfato (Pi) o cuando se hidroliza a adenosin monofosfato (AMP) y pirofosfato (PPi) (Figura 21).



**Figura 21.** Molécula de adenosin trifosfato (ATP).

El método utilizado incluye el lisado de las células totales presentes en la muestra y la cuantificación mediante bioluminiscencia del ATP derivado de las células viables, reacción que se esquematiza en la Figura 22.



**Figura 22.** Esquema de la reacción química de bioluminiscencia del método utilizado.

Del estudio detallado de los resultados se desprende que el método es una herramienta útil para evaluar cuantitativamente y de forma rápida, comparando con los métodos de cultivo estándar, la vitalidad del total de las bacterias incluidas en la biopelícula oral *in vitro* tras un tratamiento antiséptico. De hecho, se demostró el efecto antiséptico de tres compuestos antimicrobianos aplicando la metodología propuesta, con resultados similares cuando se comparan con la técnica de cultivo estándar.

La técnica nos va a permitir valorar el efecto antiséptico de diferentes agentes antibacterianos, en este caso representados por tres colutorios con diferentes principios activos, clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio (CHX/CPC), aceites esenciales (EO) y fluoruro de amina/fluoruro de estaño (AFSF), tras la exposición de biopelículas maduras, obtenidos en el modelo *in vitro*, a dichos productos.

Se pudo comprobar que los EO eran substancialmente menos efectivos que CHX/CPC y AFSF. Estos resultados concuerdan con lo descrito por otros autores utilizando, por ejemplo, la misma técnica de ATP-bioluminiscencia frente a *P. gingivalis* en una biopelícula monoespecie *in vitro* (Noiri y col., 2003) o bien por diferentes técnicas en varios modelos experimentales de biopelículas (Shapiro y col., 2002; Hope y Wilson, 2004 y 2006; Takeuchi y col., 2007; Takenaka y col., 2008). Igualmente, los resultados concuerdan con lo descrito *in vivo*, donde las formulaciones de CHX han dado mejores resultados clínicos comparado con las formulaciones de EO y AFSF (Brecx, 1990; Netuschil y col., 1995).

Los resultados de esta investigación también muestran una correlación estadísticamente significativa (coeficiente de correlación de Pearson de 0,769;  $p < 0,001$ ) entre la técnica propuesta y la técnica de cultivo. Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la proporción relativa de vitalidad celular para cada colutorio calculado por ambas técnicas. Por tanto, se confirma la habilidad de esta técnica como método de evaluación de la vitalidad

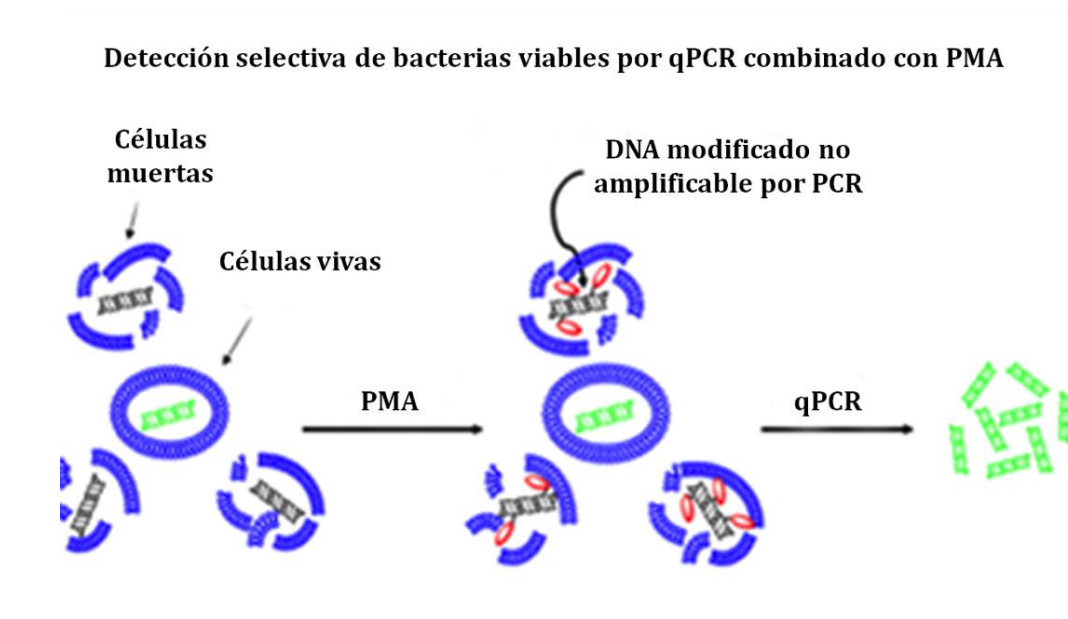
---

bacteriana en un modelo de biopelícula oral *in vitro*, entendiendo que la señal bioluminiscente generada durante la lisis celular es proporcional a la cantidad de ATP presente, y por tanto, a las células vitales.

Las mayores ventajas de este método son la independencia de cultivo y la rapidez con que se obtienen los resultados una vez recibida la muestra. En nuestro caso, testamos la cuantificación de las células viables inmediatamente después de haber tratado el consorcio bacteriano con un agente antiséptico. El mayor inconveniente es que nos informa del efecto del tratamiento aplicado sobre el total de las bacterias que constituyen la biopelícula, pero no podemos obtener el efecto individual sobre una bacteria concreta dentro del total presente, lo que podría ser de gran interés en periodontopatógenos como *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* en relación a la progresión de la enfermedad periodontal.

## **2.2. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA VITALIDAD BACTERIANA BASADO EN LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN LA MODALIDAD CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR) COMBINADA CON MONOAZIDA DE PROPIDIO (PMA)**

Se buscó una segunda alternativa metodológica a los métodos tradicionales de cultivo, que proporcionase un recuento rápido del total de las células viables presentes en el modelo de biopelícula oral propuesto, ya sea antes o después de someterlo a una situación de estrés como pudiera ser el efecto de un agente antimicrobiano, y que además posibilitase el recuento de aquellas bacterias de mayor interés en relación con la enfermedad periodontal. Para ello, utilizamos una de las herramientas más potentes que hay actualmente disponible para cuantificar bacterias, la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), pero combinada con un agente intercalante de ADN, monoazida de propidio (PMA), para cuantificar selectivamente las células vivas, discriminándolas de las muertas (Figura 23).



**Figura 23.** Esquema de la metodología basada en el uso de monoazida de propidio (PMA) para la detección selectiva de bacterias vivas por qPCR; figura adaptada de Nocker y col., 2006.

Entre las ventajas de la PCR destacan su alta especificidad y sensibilidad *versus* los métodos de cultivo tradicionales, así como la rapidez para obtener resultados (Park y col., 2011; Fittipaldi y col., 2012). Pero tiene una gran desventaja, y es que detecta tanto el ADN de las células vivas como el de las muertas, que está descrito que puede tardar en degradarse hasta tres semanas (Nogva y col., 2003; Rudi y col., 2005, Nocker y col., 2006; Cawthorn y Witthuhn, 2008). Por tanto, un método de diagnóstico basado en esta técnica sobreestimaría el número de células potencialmente patógenas tras un tratamiento (Nogva y col., 2003; Rudi y col., 2005; Nocker y col., 2006; Cawthorn y Witthuhn, 2008), como hemos podido comprobar en este estudio y que se muestra en los resultados.

Recientemente, se ha propuesto una alternativa metodológica basada en la integridad de la membrana como criterio para distinguir entre células bacterianas vivas y muertas. Esta metodología combina el uso de un fluorocromo vital, el PMA, con la velocidad y sensibilidad de la qPCR. La técnica se basa en la habilidad de las células bacterianas con la membrana intacta de impedir que este compuesto, el

---

PMA, penetre en su interior, mientras que las células con daños irreversibles no presentarán ninguna barrera frente al mismo. Una vez dentro de la célula, el fluorocromo se intercalará con el DNA, y tras una exposición a una fuente de luz visible, formará un enlace covalente mediante el grupo azida presente en su estructura. La fotólisis convertirá el grupo azida del PMA en un radical nitreno altamente reactivo, que podrá reaccionar con la molécula de ADN, modificándola. Esta modificación en la molécula de ADN inhibirá su amplificación. Al mismo tiempo, el exceso de fluorocromo que no haya reaccionado con el ADN, lo hará con las moléculas de agua presentes, formando una hidroxilamina inactiva. Por tanto, mediante la PCR, únicamente se detectará células vivas (Nogva y col., 2003; Rudi y col., 2005; Nocker y col., 2006 y 2007; Pan y Breidt, 2007; Cawthorn y Witthuhn, 2008; Lee y Levin, 2009; Nocker y Camper, 2009; Kramer y col., 2009; Chang y col., 2010; Nam y col., 2011; Fittipaldi y col., 2012).

Esta técnica ha sido aplicada con éxito en un amplio abanico de muestras, incluidas recientemente muestras orales (Nocker y col., 2007; Pan y Breidt, 2007; Kramer y col., 2009; Lee y Levin, 2009; Chang y col., 2010; Loozen y col., 2011; Takahashi y col., 2011; Nam y col., 2011) aunque hasta el momento no ha sido aplicada sobre biopelículas orales. Hay que tener en cuenta que no todas las bacterias han respondido adecuadamente a esta metodología (Flekna y col., 2007).

#### **Aplicación de la técnica PMA-qPCR con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* en estado planctónico**

Debido a lo anteriormente expuesto, se realizó un primer estudio para comprobar que las cepas periodontopatógenas de mayor interés incluidas en el modelo de biopelícula *in vitro* propuesto en la memoria respondiesen adecuadamente a dicha tecnología y así estudiar la idoneidad de dicha técnica para la cuantificación selectiva de las células viables mediante la técnica de PCR.

Los resultados confirman la eficacia y aplicabilidad del método propuesto, basado en la combinación de PMA (concentración final 100  $\mu$ M) y qPCR, para evaluar la viabilidad bacteriana de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en estado planctónico.

En primer lugar, se confirmó lo descrito por otros autores en cuanto a la incapacidad de la técnica de qPCR para discernir entre el ADN procedente de células vivas y de células muertas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan las señales procedentes de la misma muestra con todas sus células vivas o todas sus células muertas (Nogva y col., 2003; Rudi y col., 2005, Nocker y col., 2006; Cawthorn y Witthuhn, 2008).

En segundo lugar, se demostró, para ambas especies bacterianas, que el tratamiento de la muestra con PMA no inhibe significativamente la amplificación del ADN procedente de células vivas por qPCR, mientras que sí se produce una reducción significativa cuando el ADN procede de células muertas. Estos resultados coinciden con lo observado en otras publicaciones científicas (Nocker y col., 2006 y 2007; Cawthorn y Wititthulm, 2008; Soejima y col., 2008; Lee y Levin, 2009; Kramer y col., 2009; Loozen y col., 2011).

Y en tercer lugar, el estudio nos permitió comprobar la eficacia del PMA combinado con la qPCR para diferenciar entre células bacterianas de estas especies vivas y muertas, pero en este caso cuando ambos estados vitales se encuentran presentes en una misma muestra a diferentes ratios. Este comportamiento ha sido observado por otros autores utilizando la misma técnica pero aplicada a diferentes especies bacterianas (Nocker y col., 2007; Pan y Breidt, 2007; Kramer y col., 2009; Lee y Levin, 2009; Chang y col., 2010; Loozen y col., 2011; Takahashi y col., 2011; Nam y col., 2011).

---

### **Análisis de la vitalidad de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y bacterias totales en estado de biopelícula mediante PMA-qPCR**

Una vez comprobado que el método descrito de PMA-qPCR, basado en el tratamiento con PMA de muestras mixtas de bacterias vivas y muertas en estado planctónico seguido de la cuantificación por qPCR para las especies *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, es efectivo para la cuantificación selectiva de células vivas, así como eficaz para prevenir la amplificación del ADN procedente de células muertas, se procedió a testar su validez frente a las mismas bacterias en estado de biopelícula. Además, la metodología propuesta se testó para cuantificar el número de bacterias vivas de *F. nucleatum* así como del conjunto de las bacterias incluidas en el modelo de biopelícula subgingival *in vitro*.

Ya que la cuantificación de células viables bacterianas por qPCR, en nuestro caso, se basa en curvas estándar, en primer lugar se quiso ver si la adición de PMA afectaba a dichas curvas tanto en el valor como en el rango de detección. Comparando ambas curvas estándar, en los cuatro casos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La línea de regresión muestra una eficacia similar en todos los casos, lo que demuestra que el tratamiento con PMA antes de la extracción del ADN no tiene efecto en la detección de las bacterias viables por qPCR. De acuerdo con trabajos publicados previamente, vemos que el PMA no afecta a la detección por qPCR de las células viables; igualmente el rango de detección de las bacterias viables presentes en una muestra no se vio afectado (Nocker y col., 2006 y 2007; Pan y Breidt, 2007; Cawthorn y Wititthulm, 2008; Soejima y col., 2008; Lee y Levin., 2009; Kramer y col., 2009; Chang y col., 2010; Loozen y col., 2011; Nam y col., 2011; Takahashi y col., 2011). Queda, por tanto, patente la gran habilidad del PMA para penetrar selectivamente en las células con su membrana celular dañada, sin ejercer ninguna influencia en la eficiencia de la qPCR (Nocker y col., 2006 y 2007; Hein y col., 2007; Soejima y col., 2008; Nocker y Camper, 2009).

En cuanto a la cuantificación de bacterias viables totales dentro de la biopelícula antes del tratamiento con un agente antimicrobiano, cuantificando antes y después de adicionar PMA (60,7% (DS=17,1)), se confirma lo observado en el primer trabajo expuesto en la memoria, donde se indica que el 60,7% (DS=9,5) de las células incluidas en la biopelícula están vivas, así como lo descrito por otros autores (Branda y col., 2005).

Para demostrar que la técnica es útil a la hora de evaluar el efecto antibacteriano de un producto, así como para evaluar el número de bacterias viables presentes en el modelo de biopelícula *in vitro* desarrollado en la memoria, se seleccionó el alcohol isopropílico al 70% por su alto poder antiséptico, exponiendo la biopelícula al mismo durante 1, 5, 10 o 30 minutos. En este caso, no solo evaluamos el efecto del antimicrobiano en el total de las células, como ocurría con el método de ATP-bioluminiscencia, sino también en los patógenos bacterianos incluidos en el modelo de biopelícula, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, o del patógeno oportunista *F. nucleatum*.

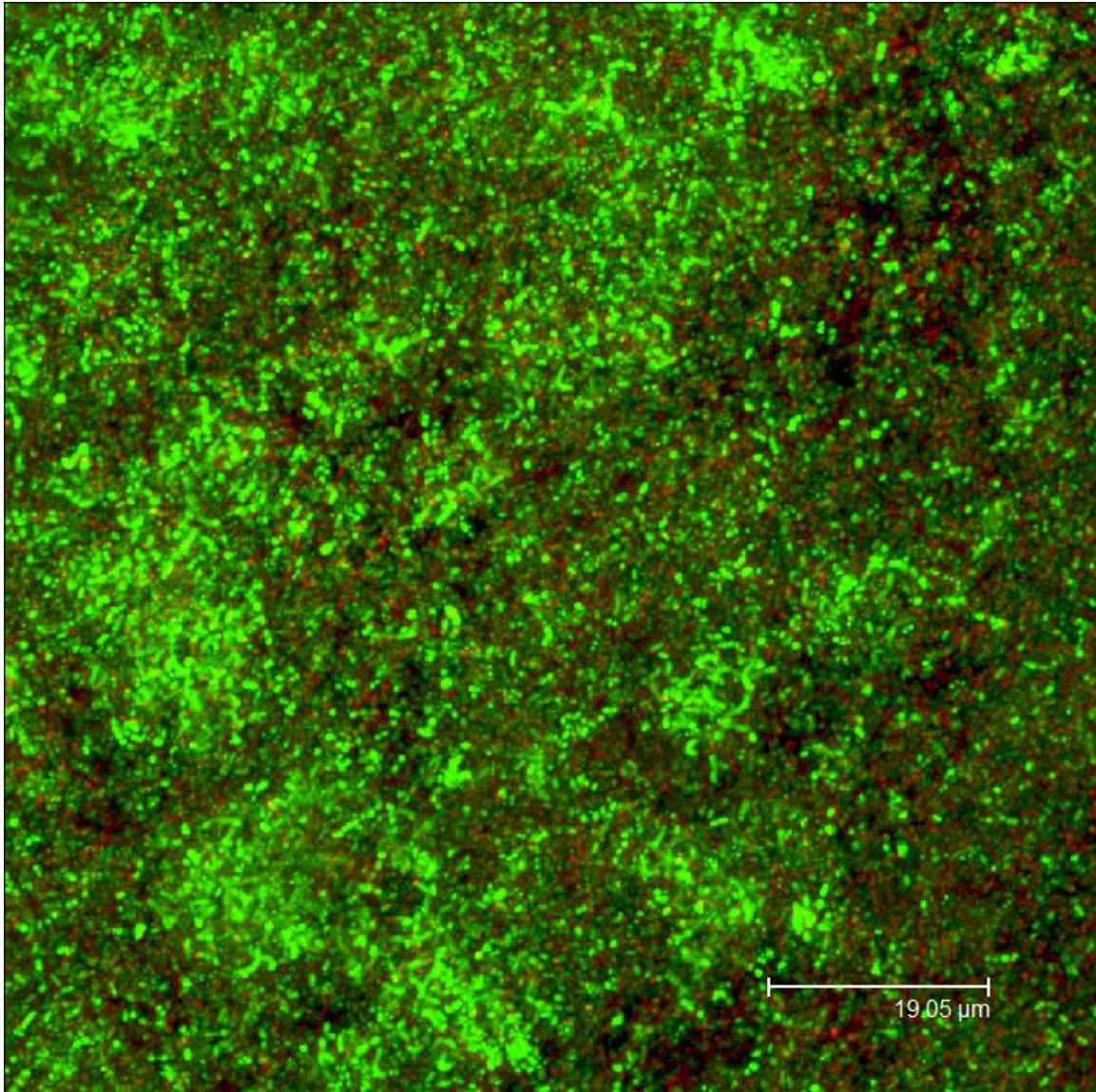
Los resultados obtenidos muestran que, en concordancia con lo expuesto por trabajos previos (Nocker y col., 2006 y 2007; Pan y Breidt, 2007; Cawthorn y Witthulm, 2008; Soejima y col., 2008; Kramer y col., 2009; Nocker y Camper, 2009; Lee y Levin, 2009; Chang y col., 2010; Loozen y col., 2011; Nam y col., 2011; Takahashi y col., 2011), el PMA es capaz de distinguir entre células vivas y muertas en muestras complejas, inhibiendo la amplificación por qPCR del ADN procedente de células muertas, cuando las biopelículas son expuestas durante diferentes tiempos a un agente antimicrobiano. El método es capaz de cuantificar el progresivo descenso del número de bacterias vivas dentro de la biopelícula por efecto del compuesto antiséptico.

Ha quedado demostrado, por tanto, que la técnica es útil para detectar y cuantificar selectivamente las bacterias vivas en muestras complejas con presencia de células muertas, como es la biopelícula oral desarrollada *in vitro*, de una manera

rápida y precisa. Esto resultará especialmente útil para la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad en relación a un tratamiento terapéutico aplicado, así como una herramienta poderosa para evaluar la eficacia antimicrobiana de estrategias terapéuticas.



# CONCLUSIONES

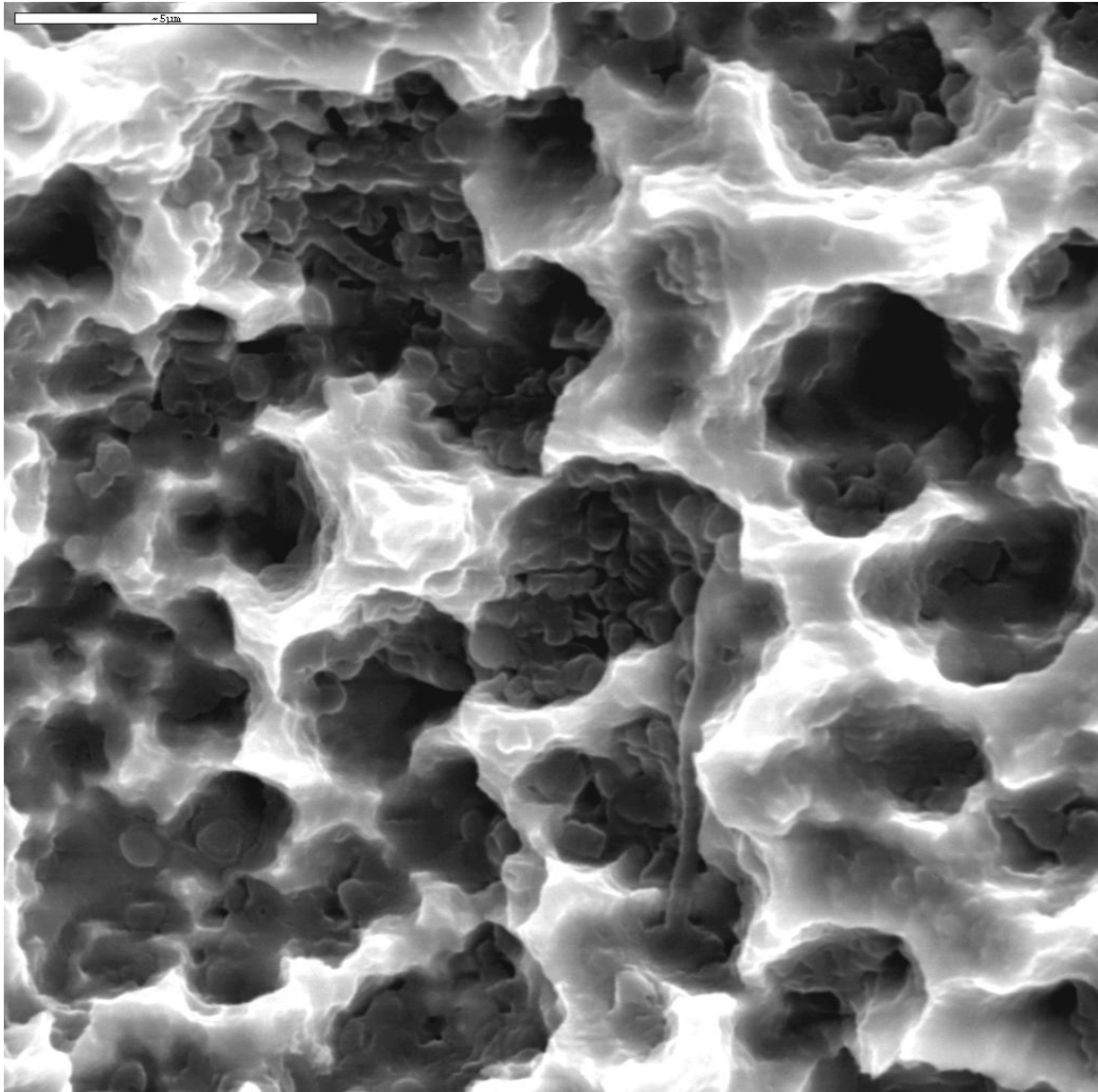




1. El modelo experimental de biopelícula oral *in vitro* desarrollado es un sistema reproducible y sencillo de manejar, que nos permite controlar las condiciones ambientales y determinar la composición bacteriana que lo constituye. La biopelícula generada en el modelo experimental alcanza la madurez a las 72 h de incubación, incluyendo las 6 bacterias utilizadas como inóculo y con el 60,7% de sus células vivas.
2. Se ha comprobado que las biopelículas generadas en el modelo experimental propuesto presentan una disposición estructural representativa de la placa dental y cumplen la secuencia de incorporación bacteriana descrita *in vivo* para la placa dental, y es que en las primeras horas de formación *in situ* se puede observar como las bacterias predominantes son los colonizadores primarios *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii* y *Veillonella parvula*, y como a medida que madura la biopelícula se va incorporando el colonizador secundario *Fusobacterium nucleatum* y los colonizadores tardíos *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
3. El método de cuantificación de bacterias viables basado en la bioluminiscencia procedente de la molécula adenosin trifosfato (ATP) es una herramienta útil para cuantificar de forma relativa y rápida, comparado con los métodos de cultivo estándar, el total de bacterias viables incluidas en la biopelícula oral *in vitro*. La técnica nos va a permitir valorar el efecto antiséptico de agentes antibacterianos tras la exposición de biopelículas maduras a dichos productos.
4. Se confirma la incapacidad de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para discernir entre el ADN procedente de bacterias vivas y de bacterias muertas de las especies *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, así como del resto de bacterias utilizadas en el modelo experimental de biopelícula.

5. Se demuestra que el tratamiento de la muestra con monoazida de propidio (PMA) no inhibe significativamente la amplificación del ADN procedente de bacterias vivas por qPCR, mientras que sí se produce una reducción significativa cuando el ADN procede de células muertas.
6. El estudio nos ha permitido comprobar la eficacia del PMA combinado con la qPCR para diferenciar entre bacterias de las especies *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* vivas y muertas, cuando ambos estados vitales se encuentran presentes en una misma muestra planctónica a diferentes ratios.
7. Igualmente, la técnica de PMA combinado con la qPCR es útil para detectar y cuantificar selectivamente las bacterias vivas de las especies *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, así como del total de bacterias, incluidas en muestras complejas con presencia de células muertas, como es la biopelícula oral desarrollada *in vitro*, de una manera rápida y precisa.
8. La técnica de PMA combinado con la qPCR nos va a partir evaluar el efecto antiséptico de un agente antibacteriano sobre las bacterias *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* así como del conjunto de las bacterias incluidas en el modelo de biopelícula *in vitro*, cuando las biopelículas son expuestas al mismo. El método es capaz de mostrar el descenso progresivo del número de bacterias vivas dentro de la biopelícula por efecto del compuesto antiséptico.

# BIBLIOGRAFÍA





1. Alas JA, Griffin AL, Daddies SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, y col. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1407-1417.
2. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11):5721-5732.
3. Albrektsson T, Isidor F. Consensus report: Implant Therapy. En: Lang NP & Karring T, eds. Proceedings of the 1<sup>st</sup> European Workshop on Periodontology. Berlin: Quintessence 1994; 365-369.
4. Ammann TW, Gmür R, Thurnheer T. Advancement of the 10-species subgingival Zurich Biofilm model by examining different nutritional conditions and defining the structure of the *in vitro* biofilms. *BMC Microbiol* 2012; 12:227- 240.
5. Arakawa H, Karasawa K, Igarashi T, Suzuki S, Goto N, Maeda M. Detection of cariogenic bacteria genes by a combination of allele-specific polymerase chain reactions and a novel bioluminescent pyrophosphate assay. *Anal Biochem* 2004; 333:296-302.
6. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
7. Astasov-Frauenhoffer M, Braissant O, Hauser-Gerspach I, Weiger R, Walter C, Zitzmann NU, Waltimo T. Microcalorimetric determination of the effects of amoxicillin, metronidazole and their combination on an *in vitro* biofilm. *J Periodontol* 2013 Apr 18. (Epub ahead of print).
8. Atlas RM, Bartha R. *Microbial Ecology*, 1997. 4<sup>a</sup> ed. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings Science Publishing.
9. Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001; 46:471-476.

10. Barnett ML. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 2006; 137:16S-21S.
11. Bartelt M. *Diagnostic bacteriology*. 2000. Davis Company. Philadelphia, USA.
12. Baumgartner JC, Siqueira JrJF, Sedgley CM, Kishen A. Microbiology of endodontic disease. *Ingle's Endodontics*, 2008; (7):221-24. 6<sup>a</sup> ed. John I Ingle, Leif K Bakland & J Craig Baumgartner. Hamilton Ontario, BC Decker.
13. Belibasakis GN, Thurnheer T. Validation of antibiotic efficacy on *in vitro* subgingival biofilms. *J Periodontol* 2013 May 9. (Epub ahead of print).
14. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol* 2002; 9(3):197-212.
15. Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30:7-9.
16. Blanc V, Isabal S, Sánchez MC, Llama-Palacios A, Herrera D, Sanz M, León R. Characterization and application of a flow system for *in vitro* multispecies oral biofilm formation. *J Periodontal Res* 2013; Jul 1. (Epub ahead of print).
17. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Sevelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006; 33:427-433.
18. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2007; 78:79-86.
19. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4950-4954.

- 
20. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45:191-199.
  21. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13:20-26.
  22. Breeuwer P, Abee T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* 2000; 55:193-200.
  23. Brex M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G. Efficacy of listerine, meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *J Clin Periodontol* 1990; 17:292-97.
  24. Brooun A, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:640-646.
  25. Castillo DM, Sánchez-Beltrán MC, Castellanos JE, Sanz I, Mayorga-Fayad I, Sanz M, Lafaurie GI. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol* 2011 May; 38(5):418-27.
  26. Cawthorn DM, Witthuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol* 2008; 105:1178-1185.
  27. Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63:119-123.
  28. Chen F, Cushion MT. Use of an ATP bioluminescent assay to evaluate viability of *Pneumocystis carinii* from rats. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2791-2800.

29. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: A possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129:634-636.
30. Characklis WG. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res* 1973; 7:1249-1258.
31. Chmielewsky RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Safety* 2003; 2:22-32.
32. Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci* 1983; 12(3-7):1-152.
33. Corbin A, Pitts B, Parker A, Stewart PS. Antimicrobial penetration and efficacy in an *in vitro* oral biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7):3338-3344.
34. Costerton JW. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* 2001; 9:50-52.
35. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238:86-95.
36. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:711-745.
37. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-1322.
38. Costerton JW, Khoury AE, Ward KH, Anwar H. Practical measures to control device-related bacterial infections. *Int J Artif Organs* 1993; 16:765-770.
39. Costerton JW. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriology* 1994; 176:2137-2142.
40. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, y col. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41:435-464.

- 
41. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; 280:295-298.
  42. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:114-122.
  43. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(4):847-867.
  44. De Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43(11):1131-1138.
  45. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, y col. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010; 192(19):5002-5017.
  46. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, y col. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:2837-2848.
  47. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiol* 2009; 155:2116-2126.
  48. Do Nascimento C, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Impl Res* 00, 2013, 1-7 doi: 10.1111/clr.12093.
  49. Do T, Devine D, Marsh PD. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent* 2013; 5:11-19.
  50. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 167-93.
  51. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(9):881-90.

52. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 2000; 46;S47-S52.
53. Eick S, Seltmann T, Pfister W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm—an *in vitro* study. *J Clin Periodontol* 2004; 31(5):376-383.
54. ENSE. Encuesta de Salud Nacional España. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad. Portal estadístico del SNS. <<http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2011.htm>>.
55. Fazilat S, Sauerwein R, McLeod J, Finlayson T, Adam E, Engle J, y col. Application of adenosine triphosphate-driven bioluminescence for quantification of plaque bacteria and assessment of oral hygiene in children. *Pediatr Dent* 2010; 32:195-204.
56. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004; 38:182-191.
57. Fejerskov O, Kidd EAM, Nyvad B, Baelum V. Defining the disease: an introduction. *Dental caries: the disease and its clinical management*, 2008;(1):4-6. 2ª Ed. Edited by Ole Fejerskov and Edwina Kidd; Blackwell Munksgaard Ltd, Garsington Road, Oxford, Uk.
58. Figuro E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutiérrez JM, y col. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2011; 82(10):1469-1477.
59. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 2010; 89:8-18.

- 
60. Fine DH, Furgang D, Barnett ML. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2001; 28:697-700.
61. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods*. 2012; 91(2):276-89.
62. Flekna G, Stefanic P, Wagner M, Smulders FJ, Mozina SS, Hein I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res Microbiol* 2007; 158:405-412.
63. Foster JS, Pan PC, Kolenbrander PE. Effects of antimicrobial agents on oral biofilms in a saliva-conditioned flowcell. *Biofilms* 2004; 1:5-12.
64. Frias J, Olle E, Alsina M. Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. *Infect Immun* 2001; 69:3431-3434.
65. Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:501-508.
66. Gallez F, Fadel M, Scruel O, Cantraine F, Courtois P. Salivary biomass assessed by bioluminescence ATP assay related to (bacterial and somatic) cell counts. *Cell Biochem Funct* 2000; 18:103-108.
67. Ghico JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001; 412:442-445.
68. Gould FK, Elliot TS, Foweraker J, Fulford M, Perry JD, Roberts GJ, y col. Guidelines for the prevention of endocarditis: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:1035-1042.

69. Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001; 80:363-370.
70. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc* 2006; 137:1649-57.
71. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Subgingival temperature. (I). Relation to baseline clinical parameters. *J Clin Periodontol* 1992; 19:401-408.
72. Hein I, Schneeweiss W, Stanek C, Wagner M. Ethidium monoazide and propidium monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal real-time PCR. *J Microbiol Methods* 2007; 71: 336-339.
73. Heukelekian H, Heller A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *J Bacteriol* 1940; 40:547-558.
74. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 1994. 9<sup>a</sup> Ed. Williams&Wilkins. Baltimore, USA.
75. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(5):1461-1468.
76. Hope CK, Wilson M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods* 2006; 66:390-398.
77. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2011; 2(5):435-444.
78. Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone!" –epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res* 2010; 89:879-902.
79. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008; 87:1016-1020.

- 
80. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66(3):486-505.
81. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev* 2010; 8:471-480.
82. Koneman E, Allen S, Tenenbaum J, Tenenbaum J, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico, 1999. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
83. Kramer M, Obermajer N, Bogovic Matijasic B, Rogelj I, Kmetec V. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 84:1137-1147.
84. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol* 2012; 39(5):425-433.
85. Kuramitsu HK, Chen W, Ikegami A. Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2005; 76:2047-2051.
86. Lang NP, Mombelli A, Attström R. Biopelícula y cálculo dental. *Periodontología clínica e implantología odontológica*, 2009; (8): 183-206. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana.
87. Lang NP, Berglundh T. Periimplant diseases: where are we now? Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011; 38(11):178-181.
88. Lasa I, del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *An Sist Sanit Navar* 2005; 28(2):163-175.
89. Lasa I. Biofilms bacterianos. *Actualidad SEM* 2005; 37:14-18.

90. Lee JL, Levin RE. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *J Microbiol Methods* 2009; 76:93-96.
91. Lee A, Wang HL. Biofilm Related to Dental Implants. *Implant Dent* 2010; 19(5):387-393.
92. Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS, y col. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:516-523.
93. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:999-1007.
94. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:547-558.
95. Li Y-H, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, y col. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2002; 184:2699-2708.
96. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50:353-380.
97. Lynch SV, Dixon L, Benoit MR, Brodie EL, Keyhan M, Hu P, y col. Role of the *rapA* gene in controlling antibiotic resistance of *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(10):3650-3658.
98. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. *Mol Oral Microbiol* 2011; 26:253-261.
99. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 644-654.

- 
100. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; 8:263-271.
  101. Marsh PD. Dental plaque as biofilm. *J Industrial Microbiol* 1995; 15:169-175.
  102. Marsh PD. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res* 1997; 11:176-185.
  103. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol* 2003; 149:279-294.
  104. Marsh PD, Nyvad B. The oral microflora and biofilms on teeth. *Dental caries: the disease and its clinical management*, 2008; (1):4-6. 2ª Ed. Ole Fejerskov and Edwina Kidd; Blackwell Munksgaard Ltd, Garsington Road, Oxford, Uk.
  105. Marsh PD, Martin MV. *Oral Microbiology*, 2009. 5ª Ed. Oxford, UK: Churchill Livingstone.
  106. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities conflict and control. *Periodontol 2000* 2011; 55(1):16-35.
  107. Mealey BL, Klokkevold PR Medicina Periodontal. *Periodontología clínica*, 2009; Capítulo 13. 9ª Ed. McGraw-Hill Interamericana, México DF.
  108. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55:165-199.
  109. Nam S, Kwon S, Kim MJ, Chae JC, Jae Maeng, Park JG, y col. Selective detection of viable *Helicobacter pylori* using ethidium monoazide or propidium monoazide in combination with real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 2011; 55:841-846.
  110. Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 1998; 43:277-285.

111. Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M. Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 1995; 103:355-361.
112. Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontitis. *J Periodontol* 1976; 47:373-379.
113. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 2006; 67:310-320.
114. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AK. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:5111-5117.
115. Nocker A, Camper AK. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 291:137-142.
116. Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 2003; 34(4): 804-8, 810, 812-3.
117. Noiri Y, Okami Y, Narimatsu M, Takahashi Y, Kawahara T, Ebisu S. Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* strain 381 in biofilms. *J Periodontol* 2003; 74:1647-1651.
118. O'Reilly PG, Claffey WM. A history of oral sepsis as cause of disease. *Periodontol 2000* 2000; 23:13-18.
119. Pan Y, Breidt Fjr. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl environ Microbiol* 2007; 73:8028-8031.

- 
120. Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. *In-vitro* evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent* 2010; 38:S16-20.
121. Parahitiyawa NB, Jin LJ, Leung WK, Yam WC, Samaranayake P. Microbiology of odontogenic bacteraemia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:46-64.
122. Park SN, Park JY, Kook JK. Development of *Porphyromonas gingivalis*-specific quantitative real-time PCR primers based on the nucleotide sequence of rpoB. *J Microbiol* 2011; 49:315-319.
123. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006; 42:80-87.
124. Pellegrini P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell DA, Maier T, et al. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009; 135:426-429.
125. Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 2009; 191:6804-6811.
126. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12:185-190.
127. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 1999; 283:1837-1839.
128. Pratten J, Andrews CS, Craig DQ, Wilson M. Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 189:215-218.

129. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2015-2021.
130. Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik M, y col. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol* 2007; 78:677-682.
131. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:25-37.
132. Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132:414-7.
133. Ramadan HH. Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14(3):183-186.
134. Rasiah IA, Wong L, Anderson SA, Sissons CH. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Arch Oral Biol* 2005; 50:779-787.
135. Roberts AP, Cheah G, Ready D, Pratten J, Wilson M, Mullany P. Transfer of Tn916-like elements in microcosm dental plaque. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2943-2946.
136. Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, Holck AL. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:1018-1024.
137. Sanclement JA, Webster Pl, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005; 115:578-582.

- 
138. Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006; 116:1121-1126.
139. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004; 31:1034-1047.
140. Schlafer S, Raarup MK, Wejse PL, Nyvad B, Städler BM, Sutherland DS, y col. Osteopontin reduces biofilm formation in a multi-species model of dental biofilm. *PLoS One* 2012; 7(8):e41534.
141. Schmidlin PR, Müller P, Attin T, Wieland M, Hofer D, Guggenheim B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *J Appl oral Sci* 2013; 21(1):48-55.
142. Schwarz F, Sculean A, Romanos G, Hertel M, Horn N, Scherbaum W, y col. Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants. *Clin Oral Investig* 2005; 9:111-117.
143. Scott C, Manning SC. Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J* 2003; 82:18-20.
144. Serrano-Granger J, Herrera D. La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla? *RCOE* 2005; 10(4):431-439.
145. Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 2002; 36(2):93-100.
146. Sheiham A, Netuvile GS. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000* 2000; 29:104-121.

147. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Impl Res* 2008; 19:975-982.
148. Siegrist BE, Brex MC, Gusberti FA, Joss A, Lang NP. *In vivo* early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clinical Oral Implants Research* 1991; 2:38-46.
149. Singh P, Schaeffer A, Parsek M, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000; 401:762-764.
150. Sliepen I, Van Essche M, Quirynen M, Teughels W. Effect of mouthrinses on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms in a hydrodynamic model. *Clin Oral Investig* 2010; 14(3):241-250.
151. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scandinavian J Dent Res* 1976; 84:1-10.
152. Smith GL, Socransky SS, Sansone C. "Reverse" DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4:141-145.
153. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63:322-331.
154. Socransky SS, Haffajee AD. Effect of therapy on periodontal infections. *J Periodontol* 1993; 64:754-759.
155. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
156. Socransky SS, Haffajee AD. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol 2000* 2003; 3:12-55.

- 
157. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, y col. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:352-362.
158. Socransky SS, Haffajee AD. Infecciones periodontales. *Periodontología clínica e implantología odontológica*, 2009; (9): 207-267. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana.
159. Soejima T, Lida K, Qin T, Taniai H, Seki M, Yoshida S. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2305-2313.
160. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-138.
161. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56:187-209.
162. Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:95-108
163. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147:3-9.
164. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y. Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3827-3830.
165. Tabanella G, Nowzari H, Slots J. Clinical and microbiological determinants of failing dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2009; 11:24-36.
166. Takahashi Y, Yoshida A, Nagayoshi M, Kitamura C, Nishihara T, Awano S, y col. Enumeration of viable *Enterococcus faecalis*, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 2011; 55:889-892.

167. Takenaka S, Trivedi HM, Corbin A, Pitts B, Stewart PS. Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(6):1869-1875.
168. Takeuchi H, Yamanaka Y, Yamamoto K. Morphological analysis of subgingival biofilm formation on synthetic carbonate apatite inserted into human periodontal pockets. *Aust Dent J* 2004; 49:72-77.
169. Takeuchi Y, Guggenheim B, Filieri A, Baehni P. Effect of chlorhexidine/thymol and fluoride varnishes on dental biofilm formation *in vitro*. *Eur J Oral Sci* 2007; 115:468-472.
170. Tamura A, Ara T, Imamura Y, Fujii T, Wang PL. The effects of antibiotics on *in vitro* biofilm model of periodontal disease. *Eur J Med Res* 2008; 13:439-445.
171. Theilade E, Theilade J, Mikkelsen L. Microbiological studies on early dentogingival plaque on teeth and Mylar strips in humans. *J Periodontal Res* 1982a; 17:12-25.
172. Theilade J, Fejerskov O, Karring T, Rölla G, Melsen B. TEM of the effect of sucrose on plaque formation on Mylar and tooth surfaces in monkeys. *J Periodontal Res* 1982b; 61:570.
173. Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res* 2009; 23:39-48.
174. Teles FR, Teles RP, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, y col. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* 2011; 47:95-104.
175. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc* 2006; 137: 10S-15S.
176. Tolker-Nielsen T, Molin S. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol* 2000; 40:75-84.

- 
177. Walker C, Sedlacek MJ. An *in vitro* biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22:152-161.
178. van Winkelhoff A, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol 2000* 1999; 20:122-135.
179. Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Gobel UB, Friedmann A, y col. A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 191(1):95-101.
180. Williams RC, Paquette DW. Enfermedad periodontal como factor de riesgo de enfermedad sistémica. *Periodontología clínica e implantología odontológica*, 2009; (21): 475-495. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana.
181. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, y col. Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association. *Circulation* 2007; 116(15):1736-54.
182. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, y col. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog* 2012; 8(4):e1002623.
183. Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol* 2000; 182:7067-7069.
184. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:648-657.
185. Xu KD. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology 2000* 2004; 146:547-549.
186. Zamora A, de la Rosa C, Mosso MA, Guijarro JF, Rodríguez C. Biofilmes, escenarios de biodiversidad: *e pluribus unum*. *Sanid. Mil.* 2009; 65 (4): 246-258.

187. Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001; 80(5):1436-1440.
188. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 2009; 9:259.
189. Zijng V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, y col. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS ONE* 2010; 5(2):e9321.
190. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8):286-291.
191. Zobell CE. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 1943; 46:39-56.

