



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROYECTO SERVICIO SOCIAL:

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE UN EXTRACTO
ESTANDARIZADO DE *Heliopsis longipes* SOBRE BIOPELÍCULAS
CARIOGÉNICAS Y PERIODONTOPATÓGENAS

ALUMNO: ESCOTO RANGEL SERGIO ENRIQUE

ASESOR INTERNO: SUSANA AURORA MACIN CABRERA, Vo Bo

NÚM. ECO. 17984

ASESOR INTERNO: ALEJANDRO PALMA RAMOS, Vo Bo

NÚM. ECO. 15941

ASESOR EXTERNO: VALERIA ESPINDOLA SOTRES, Vo Bo

CÉDULA DE MAESTRÍA: 12776100

FECHA: SEPTIEMBRE 2024

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
JUSTIFICACIÓN.....	2
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
MARCO TEÓRICO	4
BACTERIAS CARIOGÉNICAS.....	6
BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Cultivo de <i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277) y <i>P. intermedia</i> (ATCC 25611).....	8
Cultivo de <i>A. actinomycetemcomitans</i> (ATCC 29522)	8
Cultivo de <i>S. mutans</i> (ATCC 25175) y <i>L. acidophilus</i> (ATCC 33277).....	8
Crecimiento de <i>S. mutans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i>	8
Morfología colonial:.....	8
Morfología microscópica:.....	9
Formación del banco de cepas estudio utilizando la técnica de conservación en glicerol	9
Formación de biopelículas cariogénicas (<i>S. mutans</i> y <i>L. acidophilus</i>) en superficie abiótica (cubreobjetos de vidrio).....	9
Formación de biopelículas periodontopatógenas (<i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> y <i>P. intermedia</i>) en superficie abiótica (cubreobjetos de vidrio).....	10
Determinación del efecto antibacteriano del extracto estandarizado de <i>Heliopsis longipes</i> por la técnica en difusión en pozo, para cultivo mixto en bacterias cariogénicas y periodontopatógenas	10
RESULTADOS.....	11
MORFOLOGÍA COLONIAL Y MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	11
BACTERIAS CARIOGÉNICAS.....	11
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 (<i>S. m.</i>).....	11
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 33277 (<i>L. a.</i>).....	12
BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS	12
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611 (<i>P. i.</i>).....	12
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 (<i>P. g.</i>).....	13
<i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 (<i>A. a.</i>).....	14
FORMACIÓN DEL BANCO DE CEPAS DE ESTUDIO.....	14
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS	15
INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DEL EXTRACTO DE <i>Heliopsis longipes</i> POR LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN POZO, PARA CULTIVO MIXTO EN BACTERIAS CARIOGÉNICAS Y PERIODONTOPATÓGENAS	17

DISCUSIÓN	19
MORFOLOGÍA COLONIAL Y MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO	19
FORMACIÓN DEL BANCO DE CEPAS DE ESTUDIO	19
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS	20
BIOPELÍCULA CARIOGÉNICA	20
BIOPELÍCULA PERIODONTOPATÓGENA.....	20
INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DEL EXTRACTO DE <i>Heliopsis longipes</i> POR LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN POZO, PARA CULTIVO MIXTO EN BACTERIAS CARIOGÉNICAS Y PERIODONTOPATÓGENAS	22
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	25
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	27
ANEXOS.....	28
ANEXO 1. MÉTODOS UTILIZADOS.....	28
1.1 MÉTODO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR	28
1.2 MÉTODO PARA LA ESTERILIZACIÓN DE SUERO DE CABALLO	28
1.3 MÉTODO DE PREPARACIÓN PARA SOLUCIONES ESTÉRILES DE VANCOMICINA Y BACITRACINA.....	29
1.4 MÉTODO DE PREPARACIÓN PARA SOLUCIÓN ESTÉRIL DE HEMINA-MENADIONA	30
1.5 MÉTODO PARA LA ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	30
1.5.1 Método para medios de cultivo sólidos (agar):.....	30
1.5.1.1 Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI):	30
1.5.1.2 Agar Man, Rogosa & Sharpe (MRS):	31
1.5.1.3 Agar Soya Trypticosa Vancomicina-Bacitracina:.....	31
1.5.1.4 Agar sangre	32
1.5.2 Método para medios de cultivo líquidos:.....	32
1.5.2.1 Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI):	32
1.5.2.2 Caldo Man, Rogosa & Sharpe (MRS):	33
1.5.2.3 Caldo Soya Trypticosa Vancomicina-Bacitracina:.....	33
1.5.2.4 Caldo BHI enriquecido con sangre:.....	33
1.6 MÉTODO PARA FROTIS BACTERIANO	34
1.6.1 Fijación con etanol para la preparación de frotis bacteriano.....	35
1.7 MÉTODO PARA LA TINCIÓN DE GRAM	35
1.8 MÉTODO PARA LA ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL SUCIO.....	36
ANEXO 2. COMPENDIO DE MATERIALES, EQUIPOS Y EXCIPIENTES	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Densidad de biopelículas adheridas a cubreobjetos de vidrio.	15
Tabla 2. Diámetros del halo de inhibición para bacterias cariogénicas.	18
Tabla 3. Lista de materiales, equipos y excipientes utilizados durante el desarrollo del presente proyecto.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de la biopelícula dental	5
Figura 2. Morfología de <i>S. mutans</i>	11
Figura 3. Morfología de <i>L. acidophilus</i>	12
Figura 4. Morfología de <i>P. intermedia</i>	13
Figura 5. Morfología de <i>P. gingivalis</i>	13
Figura 6. Morfología de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	14
Figura 7. Viales de cepas hechos con la técnica de conservación en glicerol.	14
Figura 8. Formación de biopelícula de bacterias cariogénicas.....	16
Figura 9. Formación de biopelículas periodontopatógenas.....	17
Figura 10. Fotografías del ensayo de inhibición en biopelícula cariogénica	18
Figura 11. Campana de flujo laminar limpia.	28
Figura 12. Esterilización de suero de caballo mediante sistema de filtración al vacío.	29
Figura 13. Imágenes tomadas a partir de la elaboración de medios de cultivo	34
Figura 14. Kit de tinción de Gram.....	35
Figura 15. Esterilización de material sucio y limpieza del autoclave.	36

INTRODUCCIÓN

Las caries y la enfermedad periodontal representan desafíos significativos para la salud bucal en todo el mundo. A pesar de los avances en la odontología preventiva y terapéutica, estos padecimientos continúan afectando a una gran parte de la población, tanto en su salud oral como en su calidad de vida general. Así mismo, la búsqueda de tratamientos alternativos y complementarios ha llevado a investigaciones sobre el potencial terapéutico de diversos productos de origen vegetal con actividad farmacológica, donde destaca la *Heliopsis longipes*, la cual es una planta utilizada en medicina tradicional por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antibacterianas. En este proyecto, se estudió el posible efecto de inhibición del crecimiento bacteriano de un extracto etanólico de raíces de *Heliopsis longipes* estandarizado como un sistema auto-microemulsificable sobre biopelículas cariogénicas y periodontopatógenas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los importantes avances científicos y tecnológicos mundiales orientados a prevenir y tratar la caries y la enfermedad periodontal, su prevalencia sigue siendo alta; no habiendo sido suficientes las estrategias para educar a la población general en hábitos alimenticios e higiene bucodental, tales como la remoción mecánica de la biopelícula de placa dental mediante cepillado, ni el desarrollo y la aplicación de diversos productos para la higiene y desinfección bucodental, así como la farmacoterapia con antimicrobianos cuando ha avanzado la enfermedad, ya que día a día se incrementa la resistencia bacteriana a los fármacos existentes en el mercado. Una alternativa es aprovechar el conocimiento proporcionado por la medicina tradicional sobre plantas medicinales con actividad antimicrobiana, así como el avance de la nanotecnología farmacéutica para proponer medicamentos o antisépticos herbolarios de base nanoestructurada como los sistemas auto-microemulsificables que pueden cargar extractos poco solubles y con actividad antimicrobiana como el extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* que, para su dosificación bucodental como antimicrobiano local y de acción prolongada, requiere incorporarse en formas farmacéuticas como geles o películas, así como demostrar actividad contra las biopelículas de placa dental

integradas, respectivamente, por las bacterias responsables de la caries y de la enfermedad periodontal. Para esto último se requiere desarrollar y validar métodos microbiológicos que permitan profundizar en la evaluación la actividad farmacológica de un producto natural, por ejemplo; la formación *in vitro* de biopelículas con bacterias cariogénicas y periodontopatógenas.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con el informe publicado en 2022 por la Organización Mundial de la Salud sobre el estado de la salud bucal mundial se calcula que aproximadamente 3,500 millones de personas en todo el mundo son afectadas por enfermedades bucales, y tres de cada cuatro personas afectadas residen en países de ingresos medios (OMS, 2022). México se ubica entre las naciones con una alta frecuencia de enfermedades bucales, ya que más del 90% de la población mexicana sufre de caries dental. Por otra parte, la enfermedad periodontal afecta al 7.1% de la población adulta, mostrando una mayor prevalencia a medida que aumenta la edad (Moreno et al., 2023; SIVEPAB, 2021). Las investigaciones actuales se orientan a aportar información relevante para el posible desarrollo de estrategias efectivas de prevención, diagnóstico y tratamiento con antimicrobianos, basándose en la interrupción de la formación de biopelículas bacterianas. Por lo tanto, es esencial el estudio de las condiciones experimentales para generar *in vitro*, biopelículas de placa dental con las principales bacterias responsables de cada una de estas enfermedades. Para aportar a este objetivo, con este proyecto se propone utilizar cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* como principales agentes infecciosos responsables de la aparición de caries, y de cepas de *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia*, como principales agentes infecciosos y de mayor patogenicidad durante el desarrollo de gingivitis y la enfermedad periodontal en general. El propósito del presente proyecto fue que el prestador del servicio social obtuviera conocimientos fundamentales y se habilitará en las técnicas para obtener ambos tipos de biopelículas de placa dental, a partir de métodos de crecimiento bacteriano pelicular *in vitro* previamente desarrollados por el equipo de investigación integrado por personal investigador de los Laboratorios de Inmunología (N-014) y de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106) de la Unidad de Investigación,

Docencia y Servicios del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco, para finalmente evaluar la actividad antibacteriana sobre la formación de biopelículas cariogénicas y periodontopatógenas, de una muestra de extracto etanólico de raíces de *H. longipes*, estandarizado en forma de sistema auto-microemulsificable.

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar *in vitro* biopelículas cariogénicas y periodontopatógenas, así como evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de un extracto etanólico de raíces de *H. longipes* estandarizado sobre la formación de ambas biopelículas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar *S. mutans*, *L. acidophilus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* en medios enriquecidos e identificación macro y microscópica.
- Crear un banco de las cepas de estudio utilizando la técnica de conservación en glicerol.
- Establecer las condiciones experimentales para la formación *in vitro* de biopelículas cariogénicas con las bacterias *S. mutans* y *L. acidophilus*.
- Establecer las condiciones experimentales para la formación *in vitro* de biopelículas periodontales con las bacterias *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*.
- Determinar el efecto antibacteriano del extracto estandarizado de *H. longipes* por la técnica de difusión en pozo, para cultivo mixto en bacterias cariogénicas y periodontopatógenas.

MARCO TEÓRICO

Los trastornos de la salud oral representan una preocupación significativa para la salud pública debido a su amplia incidencia y su considerable repercusión en el bienestar individual y social. En la actualidad, aproximadamente el 90% de la población mundial se encuentra en riesgo de experimentar algún tipo de enfermedad bucal (Moreno et al., 2023).

La caries dental es una enfermedad dinámica, multifactorial, no transmisible, influenciada por biopelículas y hábitos alimenticios, que se caracteriza por la pérdida gradual de minerales, provocando una lesión cariosa en los tejidos duros de los dientes. El consumo frecuente de azúcares y el entorno ácido creado por esta biopelícula alteran el equilibrio natural de microorganismos beneficiosos de la cavidad oral hacia un estado de crecimiento desproporcionado de bacterias como *Streptococcus mutans* y especies de *Lactobacillus*, como *Lactobacillus acidophilus*, las cuales producen caries dental (Laudenbach & Kumar, 2020).

Por otra parte, la enfermedad periodontal es una condición inflamatoria crónica, no transmisible, que está vinculada a la formación y crecimiento de biopelículas bacterianas y se caracteriza por la degeneración progresiva de las estructuras de soporte dental, lo que puede resultar en la pérdida del diente. Sus manifestaciones clínicas principales incluyen: inflamación y sangrado de las encías, formación de bolsas periodontales y en casos severos pérdida de inserción (pérdida de hueso alveolar). Los microorganismos que residen en la biopelícula subgingival colaboran entre sí, generando una interacción sinérgica dentro del microambiente oral. Entre algunas bacterias involucradas en la patogénesis de las enfermedades periodontales se encuentran *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* (Fragkioudakis et al., 2021).

La formación de biopelículas se considera un mecanismo de patogenicidad para muchos tipos de microorganismos éstas son comunidades microbianas ubicuas en la naturaleza que crecen dentro de una matriz de exopolisacárido el cual autoproducen y se adhieren a superficies inertes o tejidos vivos. Constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos (Castrillón et al., 2020).

La biopelícula de placa dental es un sistema complejo compuesto por células microbianas y matrices extracelulares, ubicadas tanto en superficies duras (p. ej., superficie dental) como blandas (p. ej., encías, y lengua) de la cavidad bucal humana. De acuerdo con su ubicación la biopelícula se puede clasificar como: supragingival en la que proliferan principalmente bacterias (cariogénicas) ubicadas sobre el margen de la encía y subgingival en la que proliferan bacterias (periodontopatógenas) ubicadas debajo del margen gingival, entre el diente y el tejido gingival. Las características de las superficies de unión, la disponibilidad de oxígeno y los factores del huésped influyen en su composición y función (Cai & Kim, 2023).

De acuerdo con Abdulkareem y colaboradores (2023) durante la formación de la biopelícula (Figura 1), las bacterias en la superficie se añaden mediante coagregación, esto ocurre principalmente en relaciones simbióticas, la adición de más agentes microbianos en la biopelícula significa mayor cantidad de capas y entre mayor cantidad de capas existe menor cantidad de oxígeno, lo que brinda las condiciones propicias para la colonización bacteriana anaeróbica. La adhesión de bacterias planctónicas consiste en la unión de sitios específicos en la cavidad bucal, para la unión de colonizadores primarios, esta adhesión comprende la unión de enlaces débiles como los de Van der Waals o los de ácido-base de Lewis.

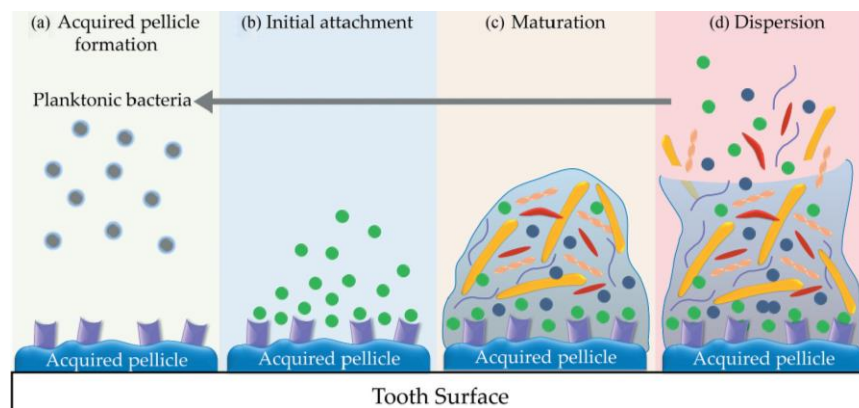


Figura 1. Formación de la biopelícula dental (Abdulkareem et al., 2023).

La maduración de la biopelícula ocurre cuando se añaden los colonizadores tardíos como *P. gingivalis* y la coagregación de las bacterias consiste en una adición específica a sitios receptores, principalmente se da en uniones simbióticas. En cuanto a la dispersión de bacterias, consiste en que una vez que se ha aumentado la masa y de las poblaciones

bacterianas en la biopelícula, un grupo bacteriano se desprende para colonizar una nueva superficie y regresar a un estado planctónico (Abdulkareem et al., 2023).

BACTERIAS CARIOGÉNICAS

La caries dental se desarrolla debido a la presencia de bacterias, sumado a factores como mala higiene bucal y alto consumo al azúcar. Los microorganismos que se encuentran de manera habitual en la boca se acumulan en los dientes su metabolismo acidogénico convierte los azúcares de la dieta en ácidos que reducen el pH, dañando los dientes debido a que se eliminan minerales, lo que conlleva a la formación de cavidades y daños en la estructura dental (Bertolini et al., 2022).

BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

A pesar de su cercanía entre las biopelículas supra y subgingivales, estas difieren entre sí principalmente por sus condiciones de crecimiento, como el potencial redox, pH y factores nutricionales. Para las bacterias anaeróbicas, la sinergia que desarrollan con otros organismos que consumen oxígeno en las biopelículas subgingivales resulta de vital importancia, ya que facilita la conversión a un microambiente anaeróbico lo que favorece su crecimiento (Belibasakis et al., 2023). Durante la formación de la biopelícula, las bacterias en la superficie se añaden mediante coagregación, esto ocurre principalmente en relaciones simbióticas, la adición de más agentes microbianos en la biopelícula significa mayor cantidad de capas y entre mayor cantidad de capas existe menor cantidad de oxígeno, lo que brinda las condiciones propicias para la colonización bacteriana anaeróbica (Cabrini et al., 2020).

En cuanto a la enfermedad periodontal, se han agrupado las bacterias involucradas en distintos complejos de acuerdo con su patogenicidad en la enfermedad. Las bacterias del complejo rojo (*P. gingivalis*) son consideradas como responsables de la enfermedad periodontal crónica y están vinculadas al sangrado de encías y al aumento de la profundidad de las bolsas periodontales. Las bacterias del complejo naranja (*P. intermedia*), preceden a las del complejo rojo, son vistas como posibles patógenos periodontales. Las bacterias del complejo verde (*A. actinomycetemcomitans*), amarillo, morado y azul consisten en bacterias que colonizan la superficie dental en las primeras etapas de la formación de biopelículas y se consideran

compatibles con la salud periodontal. Por lo tanto, la disbiosis de cada uno de los complejos puede propiciar un ecosistema adecuado para el surgimiento de agentes asociados a la patogenia de la enfermedad periodontal (Cabrini et al., 2020).

Una bolsa periodontal se forma cuando las encías pierden adherencia al diente debido a o la infección causada por la acumulación de un conjunto de bacterias que forman una biopelícula (Laudenbach & Kumar, 2020). Sin embargo, la bolsa periodontal ofrece un depósito natural accesible para la inserción de un dispositivo dispensador, lo que hace que los sistemas de administración de medicamentos dentro de ella sean una vía de aplicación de tratamientos tópicos. Estos sistemas prometen una menor incidencia de efectos secundarios no deseados, una mayor eficacia y una mejor adherencia al tratamiento por parte del paciente (Chi et al., 2019). Se están explorando diversas formas y formulaciones de sistemas portadores de fármacos, como películas, geles, micropartículas, nanopartículas, sistemas vesiculares, entre otros. Particularmente los geles, pueden aplicarse fácilmente en el lugar de acción, liberando rápidamente el fármaco, adhiriéndose a una amplia área de mucosa en las bolsas dentales y manteniendo concentraciones terapéuticas de antibióticos gracias a su capacidad bioadhesiva (Chi et al., 2019).

Heliopsis longipes es una planta originaria de la región central de México, popularmente se conocen como "chilcuague", en la medicina tradicional sus raíces son ampliamente utilizadas como analgésico. El componente fitoquímico principal en estas raíces es una alcaloide bioactiva llamada afinina, que es una isobutilamida alifática insaturada (N-isobutil-2E, 6Z, 8E-decatrienamida), también conocida como spilanthol (spilanthol en inglés). Tanto la afinina como varios compuestos orgánicos de las raíces de *H. longipes* son responsables de diversos efectos biológicos, como anestésicos locales, aromatizantes, insecticidas y larvicidas, antimicrobianos, bactericidas y fungistáticos. Diversos estudios en roedores y macrófagos han demostrado que sus efectos farmacológicos pueden ser antiinflamatorios, antinociceptivos, ansiolíticos y diuréticos. Las pruebas de seguridad de la afinina indicaron que presenta toxicidad aguda con una dosis letal 50 (DL₅₀) de 113 mg/Kg, de igual forma, se ha observado que no exhibe efectos mutagénicos o citotóxicos (García et al., 2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *P. gingivalis* (ATCC 33277) y *P. intermedia* (ATCC 25611)

Para la preparación del inóculo, los microorganismos se incubaron individualmente en condiciones anaeróbicas (10 % H₂, 10 % de CO₂ y N₂) a 37 °C en un medio agar sangre al 5% enriquecido con 5 mg/L hemina (Sigma-Aldrich), 1 mg/L menadiona (Merck).

Cultivo de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29522)

Para la preparación del inóculo, el microorganismo se incubó en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C en medio de cultivo Soya Trypticasa enriquecido con 100 mL de suero de caballo estéril, 5 mg/L de vancomicina y 3 mg/L de bacitracina.

Cultivo de *S. mutans* (ATCC 25175) y *L. acidophilus* (ATCC 33277)

Para la preparación del inóculo, los microorganismos se incubaron individualmente en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C en medio de cultivo de Infusión Cerebro-Corazón (BHI) para *S. mutans* y medio de cultivo de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) para *L. acidophilus* (Caicedo-Salazar et al., 2018).

Crecimiento de *S. mutans*, *L. acidophilus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*

Morfología colonial:

Para *S. mutans* y *L. acidophilus* se observaron las colonias bacterianas tras 48 horas de incubación, para *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *P. gingivalis* se observaron las colonias bacterianas tras una semana de incubación, en ambos casos se evaluaron los siguientes aspectos:

Tamaño: Puntiforme (<1 mm), pequeñas (1 mm), medianas (2 mm) o grandes (≥3 mm).

Forma: Circular, irregular o filamentosa.

Bordes: Enteros (lisas) o lobulados (irregulares).

Brillo: Sin brillo o brillante.

Color: No pigmentadas o pigmentadas: blanco, crema, amarillo, etc.

Textura: Lisas, rugosas, mucosas o secas.

Elevación: Planas, convexas, elevadas y pulvinadas.

Transparencia: Opaca o transparente.

Consistencia: Dura, suave o mucoide.

Morfología microscópica:

Para *S. mutans*, *L. acidophilus*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *P. gingivalis* se realizó la tinción de Gram corroborando si se trata de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, además de determinar su morfología celular como cocos o bacilos.

Formación del banco de cepas estudio utilizando la técnica de conservación en glicerol

Las bacterias se cultivaron en cajas Petri con los medios adecuados: agar BHI para *S. mutans*, agar MRS para *L. acidophilus* y agar sangre para *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Se tomaron inóculos de cada cultivo y se resuspendieron en una solución estéril de glicerol al 20%, que se depositó en viales estériles. Posteriormente los viales se sellaron herméticamente y se almacenaron en un a una temperatura de 4°C.

Formación de biopelículas cariogénicas (*S. mutans* y *L. acidophilus*) en superficie abiótica (cubreobjetos de vidrio)

De los cultivos con 72 horas de crecimiento se preparó una suspensión mixta (*S. mutans* y *L. acidophilus*) de las bacterias cariogénicas en medio BHI se ajustaron dos suspensiones bacterianas de cada una de las cepas con 5 mL al tubo 3 de McFarland (900×10^6 UFC/mL), se colocaron cubreobjetos de vidrio en el agar BHI de forma inclinada y se adicionó 10 mL de la suspensión bacteriana (se realizó por duplicado), se incubaron en atmósfera de CO₂ al 5% a 37° C. El muestreo se realizó semanalmente,

se tomó un cubreobjetos de cada caja, se realizó la tinción de Gram y se observó en el microscopio óptico.

Formación de biopelículas periodontopatógenas (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*) en superficie abiótica (cubreobjetos de vidrio)

De los cultivos con horas de crecimiento se preparó una suspensión mixta (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*) de las bacterias periodontopatógenas en caldo BHI complementado con 2.5 g/L de mucina, 1 g/L de extracto de levadura (ambas de Oxoid, Thermo Scientific), 0.1 g/L de cisteína (Sigma-Aldrich), 2.0 g/L de bicarbonato de sodio (Merck), y 0.25 % (v/v) de ácido glutámico (Sigma-Aldrich), donde se ajustaron tres suspensiones bacterianas de cada una de las cepas con 5 mL al tubo 3 de McFarland (900×10^6 UFC/mL). Posteriormente se colocaron cubreobjetos de vidrio en agar sangre de forma inclinada y se adicionó 10 mL de la suspensión bacteriana (se realizó por triplicado), se incubaron a 37 °C en condiciones anaeróbicas (10 % H₂, 10 % de CO₂ y N₂). El muestreo se realizó semanalmente, se tomó un cubreobjetos de cada caja, se realizó la tinción de Gram y se observó en el microscopio óptico.

Determinación del efecto antibacteriano del extracto estandarizado de *Heliopsis longipes* por la técnica en difusión en pozo, para cultivo mixto en bacterias cariogénicas y periodontopatógenas

Se realizaron pruebas de inhibición microbiana por la técnica de difusión en pozos de agar en donde el microorganismo se encontraba en el agar BHI en cultivo mixto (*S. mutans* y *L. acidophilus*) y en los pozos se aplicaron los tratamientos correspondientes. Del extracto etanólico de *Heliopsis longipes* (EEHL) se aplicaron dos tratamientos conteniendo 240 y 160 µg afinina/mL, los cuales se solubilizaron en una mezcla de excipientes lipídicos (Transcutol® + Propilenglicol + Tween® 80), se incluyó solución salina al 0.9 %, como control negativo; y como control positivo se utilizó un antibiótico: a) Clorhexidina al 0.12% para bacterias cariogénicas. Se evaluó el crecimiento bacteriano durante 24, 48 y 72 h. Se almacenaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5%. El ensayo se realizó por triplicado.

RESULTADOS

MORFOLOGÍA COLONIAL Y MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO

Los resultados que se muestran a continuación se obtuvieron a partir del cultivo e identificación de las bacterias descrito anteriormente en los métodos.

BACTERIAS CARIOGÉNICAS

Streptococcus mutans ATCC 25175 (*S. m.*)

En la Figura 2 (inciso A), se muestra la morfología colonial de la cepa *S. mutans* cultivada en agar BHI, en donde se observan colonias pequeñas de menos de 1 mm, con bordes irregulares, de color blancas y de consistencia dura. Por otra parte, la morfología microscópica (inciso B) muestra cocos Grampositivos agrupados en cadena.

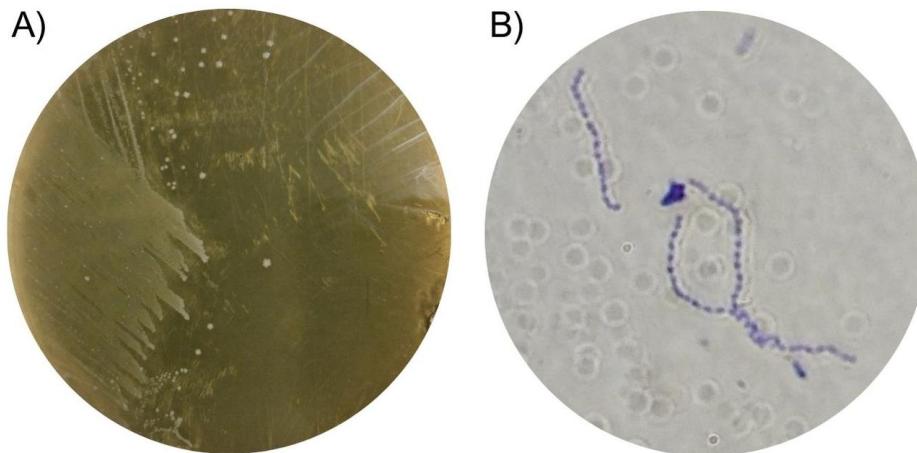


Figura 2. Morfología de *S. mutans*: A) colonial, B) microscópica.

***Lactobacillus acidophilus* ATCC 33277 (L. a.)**

En la Figura 3 (inciso A) se observa la morfología colonial de la cepa *L. acidophilus* cultivada en agar MRS, donde se observan colonias pequeñas aproximadamente de 1 mm, con bordes enteros, de textura lisa, consistencia suave y de color blanco. Por otra parte, en la morfología microscópica se observaron bacilos Grampositivos.

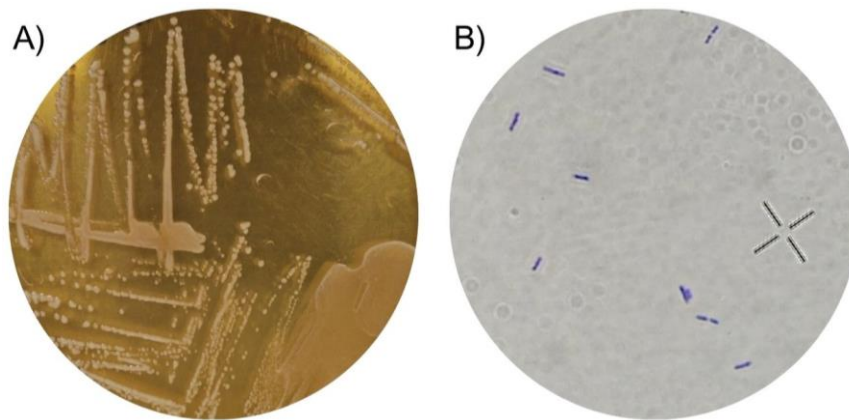


Figura 3. Morfología de *L. acidophilus*: A) colonial, B) microscópica.

BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

***Prevotella intermedia* ATCC 25611 (P. i.)**

En la Figura 4 (inciso A) con respecto a la morfología colonial de la cepa *Prevotella intermedia* cultivada en agar sangre, se observan colonias puntiformes menores a 1 mm, con bordes enteros, de color gris y de consistencia suave. Por otra parte, para la morfología microscópica (inciso B) se observaron bacilos gramnegativos en forma de coma.

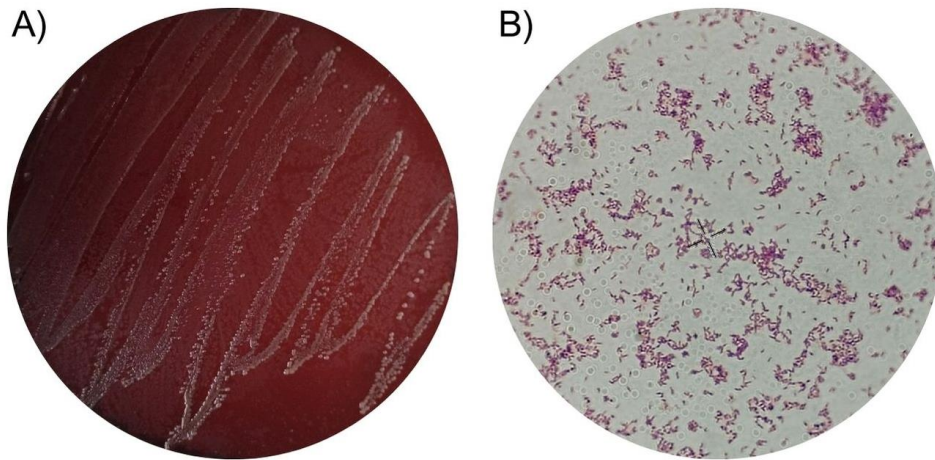


Figura 4. Morfología de *P. intermedia*: A) colonial, B) microscópica.

***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (*P. g.*)**

En la Figura 5. (inciso A) con respecto a la morfología colonial de la cepa *Porphyromonas gingivalis* cultivada en agar sangre se observan colonias medianas de aproximadamente 2 mm de diámetro, con bordes enteros, pigmentadas de color negro y textura suave. En la morfología microscópica (inciso B) se observan cocobacilos Gramnegativos.

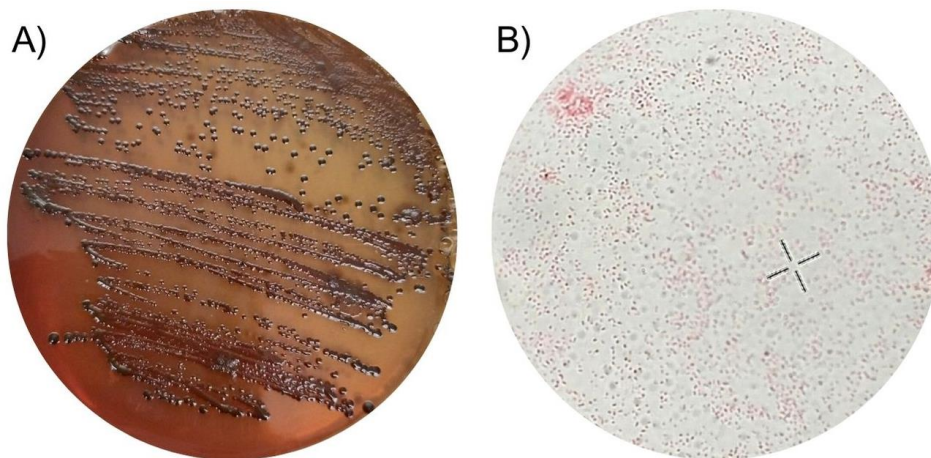


Figura 5. Morfología de *P. gingivalis*: A) colonial, B) microscópica.

***Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 (A. a.)**

En la Figura 6 (inciso A), con respecto a la morfología colonial de la cepa *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* cultivada en agar soya Trypticasa, se observan colonias grandes de aproximadamente 3 mm, con bordes ondulados, opacas, de color rosa pálido y en forma de estrella. En la morfología microscópica (inciso B), se observan cocobacilos Gramnegativos.

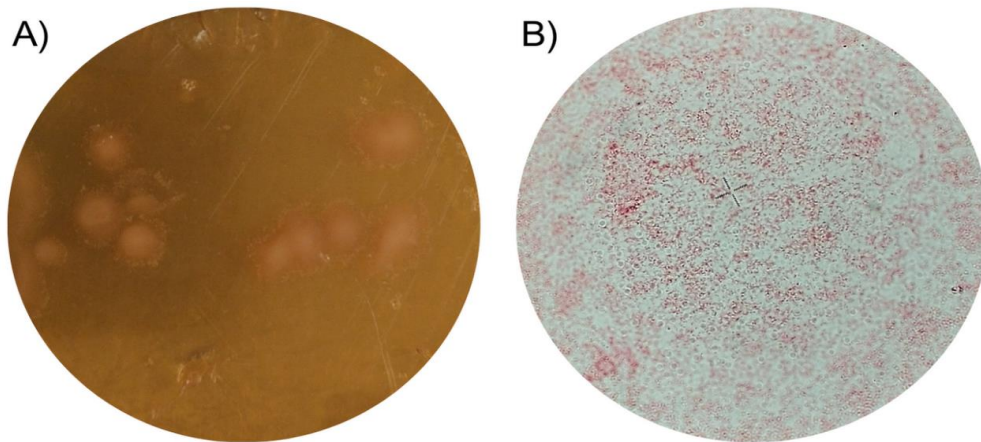


Figura 6. Morfología de *A. actinomycetemcomitans*: A) colonial, B) microscópica.

FORMACIÓN DEL BANCO DE CEPAS DE ESTUDIO

Como parte de los objetivos del estudio, se implementó un protocolo de conservación de cepas en glicerol (Figura 7). El proceso se realizó cumpliendo con las condiciones de crecimiento para cada cepa bacteriana descritas anteriormente.



Figura 7. Viales de cepas cariogénicas y periodontopatógenas hechos con la técnica de conservación en glicerol.

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Los resultados sobre el ensayo de adherencia para la formación de biopelículas mostraron que es un modelo factible ya que demostró que existe una adherencia eficiente de las cepas de estudio en los cubreobjetos tras el tiempo de incubación establecido. Los resultados permiten observar que existió mayor adherencia para la biopelícula periodontopatógena (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*) en comparación con la biopelícula cariogénica (*S. mutans* y *L. acidophilus*), ya que se observó mayor densidad de la biopelícula en el cubreobjeto (Tabla 1). Por otra parte, mediante la tinción de Gram se confirmó la presencia de las bacterias involucradas: biopelícula cariogénica (Figura 8) y biopelícula periodontopatógena (Figura 9), donde se observaron de manera clara en el microscopio óptico. Las características morfológicas resultaron ser congruentes con las obtenidas en los cultivos independientes, lo que demuestra que las condiciones de cultivo y acondicionamiento fueron correctas para la formación de la biopelícula en un entorno controlado.

Tabla 1. Densidad de las biopelículas bacterianas en cubreobjetos de vidrio.

Biopelícula		Densidad en la biopelícula
Biopelícula cariogénica	<i>S. mutans</i>	**
	<i>L. acidophilus</i>	**
Biopelícula periodontopatógena	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	***
	<i>P. gingivalis</i>	***
	<i>P. intermedia</i>	***

Nota: * Poca adherencia. ** Adherencia moderada. *** Alta adherencia.

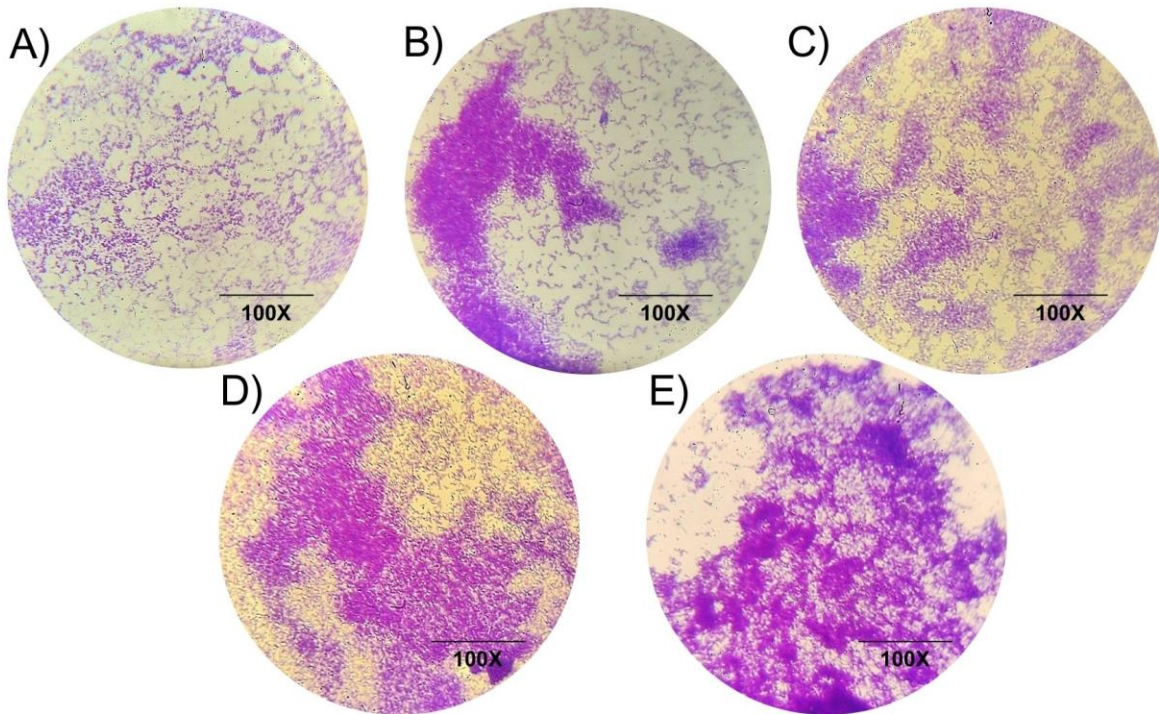


Figura 8. Formación de biopelícula de bacterias cariogénicas. Imágenes por microscopía óptica. Crecimiento semanal: A) Semana 1. B) Semana 2. C) Semana 3. D) Semana 4. E) Semana 5.

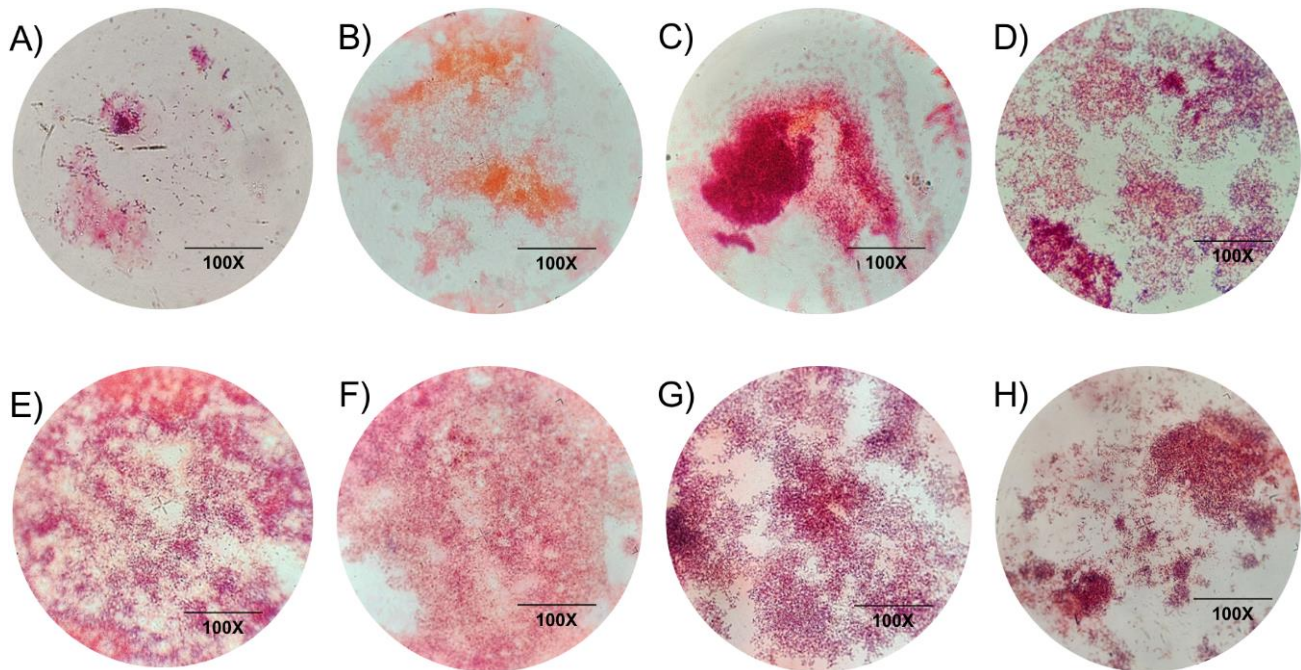


Figura 9. Formación de biopelículas periodontopatógenas. Imágenes por microscopía óptica. Crecimiento semanal: A) Semana 1. B) Semana 2. C) Semana 3. D) Semana 4, E) Semana 5. F) Semana 6. G) Semana 7. H) Semana 8.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DEL EXTRACTO DE *Heliopsis longipes* POR LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN POZO, PARA CULTIVO MIXTO EN BACTERIAS CARIOGÉNICAS Y PERIODONTOPATÓGENAS

No se observó un halo de inhibición visible para los tratamientos de *H. longipes* (Figura 10). De igual forma es importante considerar que la coloración inherente del extracto dificultó la observación de estos. Por otra parte, la clorhexidina utilizada como control positivo, mostró halos de inhibición bien definidos (Tabla 2), confirmando su eficacia en las mismas condiciones experimentales.

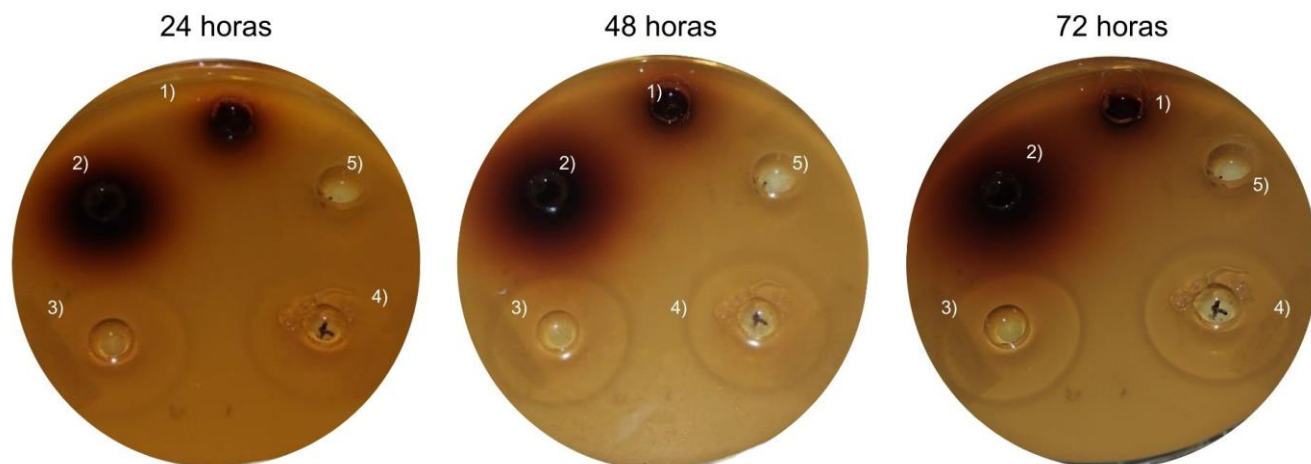


Figura 10. Fotografías del ensayo de inhibición en biopelícula cariogénica (*S. mutans* + *L. acidophilus*) 1) Extracto 160 µg. 2) Extracto 240 µg. 3) Clorhexidina. 4) Clorhexidina estéril. 5) Solución salina.

Tabla 2. Diámetros del halo de inhibición para bacterias cariogénicas.

Muestra	Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm)	Desviación estándar
Extracto 160 µg	*	*
Extracto 240 µg	*	*
Clorhexidina	20	0.95
Clorhexidina estéril	20	0.95

Por otra parte, el extracto de *H. longipes* en las concentraciones utilizadas no mostró una actividad inhibitoria contra las bacterias asociadas a la enfermedad periodontal en las condiciones experimentales utilizadas.

DISCUSIÓN

MORFOLOGÍA COLONIAL Y MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO

La identificación de la morfología colonial permitió establecer diferencias claras sobre las cepas de estudio. Estas diferencias fueron basadas en factores como la forma, tamaño, color, consistencia, textura y elevación, que coincidieron con datos reportados en la literatura como el *Atlas de Microbiología Oral: de la microbiota sana a la enfermedad*, además, la tinción de Gram empleada como una herramienta básica de identificación, resultó ser una pieza clave para la confirmación de la identidad de las bacterias, permitiendo visualizar de forma nítida la morfología y el tipo de pared celular con la que cuenta cada una (Yuan et al., 2020; Zhou et al., 2020). Estas observaciones fueron fundamentales para la clasificación inicial de las cepas proporcionando un punto de partida sólido para la continuación del estudio.

FORMACIÓN DEL BANCO DE CEPAS DE ESTUDIO

La formación de un banco de bacterias mediante la técnica de conservación de cepas en glicerol es una herramienta fundamental para la conservación a largo plazo sobre las cepas bacterianas empleadas en el presente estudio. La conservación de cepas en glicerol se ha establecido como un método eficaz para minimizar los daños celulares que pueden producirse durante el congelamiento y descongelamiento, garantizando la estabilidad y disponibilidad de las cepas en futuros experimentos (Jiang et al., 2023). El contar con un banco de bacterias facilita la continuidad de la investigación ya que permite obtener una fuente confiable de microorganismos que puede ser utilizado para futuros experimentos o para reemplazar cultivos contaminados o deteriorados, además, optimiza los recursos y el tiempo en el laboratorio ya que no sería necesario cultivar las bacterias desde su fuente original, garantizando la reproducibilidad de los resultados obtenidos a lo largo del proyecto.

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

BIOPELÍCULA CARIOGÉNICA

En la Figura 8, se muestra la imagen correspondiente a la formación de la biopelícula durante la primer y segunda semana (inciso A y B) donde se observa un crecimiento mayoritario de *S. mutans* sobre *L. acidophilus*, esto puede deberse a que *S. mutans* es una de las bacterias iniciales predominantes en cuanto a la colonización de la superficie dental, esta cepa utiliza una proteína llamada adhesina (antígeno de superficie), la cual le permite adherirse a la superficie y dar paso a la primer capa de la biopelícula (Meyer et al., 2021). Por otra parte, en el crecimiento de la tercera y cuarta semana (inciso C y D) se observa una mayor proliferación de *L. acidophilus*, esto podría explicarse a que una vez que se ha adherido *S. mutans*, este utiliza la glucosa del medio para transformarla en polímeros adhesivos de carbohidratos extracelulares, conocidos como glucanos o polisacáridos extracelulares (EPS) y estos glucanos que se forman en la superficie, crean nuevos puntos de unión para la adhesión y cohesión, facilitando interacciones adicionales entre distintas especies y comunidades microbianas. Se ha reportado que el exopolisacárido secretado por *S. mutans* ha facilitado la adherencia de distintas especies de *Lactobacillus* como *L. casei* (Cai & Kim, 2023; Wen et al., 2022). Por lo tanto, la matriz formada por el glucano de *S. mutans* podría ser un factor clave para de igual manera facilitar la adherencia de *L. acidophilus* en la formación de la biopelícula del presente estudio.

BIOPELÍCULA PERIODONTOPATÓGENA

En la Figura 9 (inciso A y B) se muestra el crecimiento de la biopelícula durante la primer y segunda semana, donde se puede observar principalmente un crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*, esto está relacionado principalmente con que uno de los factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* es la presencia de una capa de lipopolisacárido (LPS) en su superficie celular, el cual comprende un grupo de diversas moléculas de oligosacáridos y una porción específica conocida como (antígeno-O), la cual media su adhesión directa a superficies abióticas (Belibasakis et al., 2019). Además, *A. actinomycetemcomitans* es considerado uno de los colonizadores primarios de la placa

subgingival junto con *P. gingivalis*, seguido de *P. intermedia*, la cual es considerada uno de los colonizadores secundarios (Fiorillo et al., 2019). Por otra parte, de la cuarta semana, hasta la octava (inciso D, E, F, G y H) se observa una biopelícula madura, principalmente por la adición de *P. intermedia*, ya que los colonizadores primarios como *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*, facilitan la adición de otras especies bacterianas, de hecho, el número de colonizadores tardíos que se añaden a la biopelícula aumenta dependiendo de los colonizadores primarios (Abdulkareem et al., 2023). Por otra parte, en la cuarta y quinta semana (inciso D y E) puede observarse una adición mayoritaria de *P. gingivalis*, esto podría explicarse debido a que este tipo de cepas cuentan con fimbrias, los cuales son apéndices superficiales delgados que sobresalen de la membrana externa, que permiten la unión y que son importantes ya que facilitan su adhesión a la superficie además de mejorar las interacciones entre otras bacterias de la cavidad oral (Morrison et al., 2023). De igual forma, *P. gingivalis* de forma *in vivo* es capaz de liberar un grupo de enzimas conocidas en conjunto como gingipaínas que son enzimas proteolíticas, que le permiten degradar proteínas para obtener nutrientes, debido a que las bacterias fueron inoculadas en medio sangre, es posible que haya utilizado ese tipo de enzimas para obtener mayor cantidad de nutrientes del medio mejorando las interacciones con otros agentes patógenos periodontales, como *A. actinomycetemcomitans* facilitando su supervivencia y la formación de la biopelícula (Xu et al., 2020).

Adicionalmente, es importante tener en cuenta que durante la formación de la biopelícula periodontopatógena, la presencia de dos bacterias gramnegativas (*P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*) con morfologías microscópicas similares (cocobacilos) dificulta su distinción en el microscopio, impidiendo determinar si una prolifera más que la otra. Por lo tanto, se recomienda realizar estudios de PCR u otras técnicas moleculares para abordar esta limitante.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DEL EXTRACTO DE *Heliopsis longipes* POR LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN POZO, PARA CULTIVO MIXTO EN BACTERIAS CARIOGÉNICAS Y PERIODONTOPATÓGENAS

Los resultados del ensayo de inhibición (Figura 10) en las concentraciones del extracto (160 µg y 240 µg respectivamente) de *H. longipes* no mostraron algún halo visible.

La sinergia producida entre *S. mutans* y *L. acidophilus* pudo provocar la resistencia a la afinina del extracto de *H. longipes*, ya que estudios realizados en la planta *A. oleracea* la cual ha mostrado contener una gran cantidad de afinina, ha resultado tener una actividad antimicrobiana considerable contra especies de *Lactobacillus* y *S. mutans* (Spinozzi et al., 2022), por lo tanto, *S. mutans* al ser un gran productor de exopolisacáridos, los cuales son fundamentales para la formación de la estructura de la biopelícula, pudieron actuar como una barrera física que dificultó la penetración del agente microbiano (Cai & Kim, 2023) aunado a eso por el momento no se ha determinado un mecanismo antimicrobiano exacto de la afinina, sin embargo, se ha teorizado que las alquilamidas podrían provocar una desnaturalización de la membrana celular microbiana, principalmente por su naturaleza lipófila, lo que llevaría a la lisis celular. La afinina al no tener un contacto con la membrana celular debido a la barrera de exopolisacáridos podría llevar a una tolerancia antimicrobiana por parte de ambas cepas (Peretti et al., 2021). Además, es importante considerar que diversos factores como la pureza, métodos de extracción o presencia de otros fitoquímicos minoritarios pueden interferir con la actividad de la afinina del extracto de *H. longipes*, por lo que sería importante realizar pruebas que corroboren su actividad con la molécula de afinina en solitario extraída de las raíces de *H. longipes*. Finalmente, a las 48 y 72 horas (Figura 10) solamente se observó la permeación del extracto en el medio sin observar un halo de inhibición.

Por otra parte, después de 24 h y hasta las 72 h (Figura 10), las bacterias cariogénicas mostraron sensibilidad tanto a la clorhexidina como a la clorhexidina sometida a un proceso de esterilización, con un promedio de diámetros de zona de inhibición de 20 mm (Tabla 1). Este resultado confirma la adecuada susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias bajo las condiciones del experimento, ya que los valores obtenidos son comparables con los reportados en estudios previos, donde *S. mutans* mostró un promedio de 20.85 - 22.00 mm y *L. acidophilus* de 21.10 mm (Bharathi et al., 2024; Jain et al., 2023).

A pesar de que el ensayo de formación de biopelícula periodontopatógena demostró que es factible el crecimiento de las tres especies bacterianas en el mismo microambiente anaeróbico, no se observó inhibición en el crecimiento de estas bacterias en cultivos individuales en las concentraciones del extracto etanólico de *H. longipes* empleadas en este estudio por lo que no es recomendable este tratamiento para biopelícula periodontopatógena.

CONCLUSIONES

Las condiciones establecidas para el ensayo de formación de biopelículas permitieron la proliferación de las bacterias en los cubreobjetos, evidenciando la factibilidad de formar un microambiente *in vitro* que favorezca el crecimiento de las cepas *S. mutans*, *L. acidophilus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*, lo que se comprobó mediante su observación al microscopio. Esto sugiere que el modelo empleado es una opción económica y accesible para la formación de biopelículas en futuros ensayos como sustituto a materiales como la hidroxiapatita, además de proporcionar una comprensión más profunda del proceso de formación de estas.

Finalmente, en el ensayo de inhibición, el extracto de *Heliopsis longipes* en las concentraciones utilizadas no mostró una actividad antibacteriana contra las bacterias periodontopatógenas, por lo que el resultado sugiere que deben probarse otras concentraciones o formulaciones combinadas con otro agente antimicrobiano antes de proponerse como alternativa eficaz contra la enfermedad periodontal. Por otra parte, en cuanto a las bacterias cariogénicas, tampoco se observó un halo de inhibición, por lo que se recomienda probar otras técnicas para determinar la actividad antibacteriana del extracto en este tipo de modelos *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkareem, A. A., Al-Taweel, F. B., Al-Sharqi, A. J. B., Gul, S. S., Sha, A., & Chapple, I. L. C. (2023). Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *Journal of oral microbiology*, 15(1), 2197779. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2197779>
- Belibasakis, G. N., Belstrøm, D., Eick, S., Gursoy, U. K., Johansson, A., & Könönen, E. (2023). Periodontal microbiology and microbial etiology of periodontal diseases: Historical concepts and contemporary perspectives. *Periodontology* 2000, 10.1111/prd.12473. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/prd.12473>
- Belibasakis, G. N., Maula, T., Bao, K., Lindholm, M., Bostanci, N., Oscarsson, J., Ihalin, R., & Johansson, A. (2019). Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(4), 222. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040222>
- Bertolini, M., Costa, R. C., Barão, V. A. R., Cunha Villar, C., Retamal-Valdes, B., Feres, M., & Silva Souza, J. G. (2022). Oral Microorganisms and Biofilms: New Insights to Defeat the Main Etiologic Factor of Oral Diseases. *Microorganisms*, 10(12), 2413. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122413>
- Bharathi, S., Lakshmi, P., Gunasekaran, M., Lakshmi, V., Reji, A., & K., Sulthana. (2024). Comparison of the Antibacterial Efficacy of Bamboo Shoot Ethanol Extract With Chlorhexidine Mouth Rinse Against Salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: An Ex Vivo Study. *Cureus*, 16(1), e53085. <https://doi.org/10.7759/cureus.53085>
- Cabrini Carmello, J., Raquel de Annunzio, S., & Raquel Fontana, C. (2020). Composition, Structure, and Formation of Biofilms Constituted by Periodontopathogenic Microorganisms. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.90019
- Cai, J. N., & Kim, D. (2023). Biofilm ecology associated with dental caries: understanding of microbial interactions in oral communities leads to development of therapeutic strategies targeting cariogenic biofilms. *Advances in applied microbiology*, 122, 27–75. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2023.02.001>
- Caicedo-Salazar, J., Mayorga-Solórzano, F., Montañó-Tatés, V., Salazar- Garcés, M., Del Carmen-Armas, A. (2018). Efecto Antimicrobiano De Extractos Acuósos De La Cáscara, Pulpa Y Semilla De Uva (*Vitis Vinifera*) Sobre *Streptococcus Mutans*, Estudio In Vitro. *Revista Kiru*. 15(2): 77-80.
- Castrillón L., Palma A., y J., Castañeda. (2020). Actinomicetos: mecanismos de patogenicidad. *Dermatología Revista Mexicana*. Vol. 64(5): 556-570.
- Chi, M., Qi, M., A, L., Wang, P., Weir, M. D., Melo, M. A., Sun, X., Dong, B., Li, C., Wu, J., Wang, L., & Xu, H. H. K. (2019). Novel Bioactive and Therapeutic Dental Polymeric Materials to Inhibit Periodontal Pathogens and Biofilms. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 278. <https://doi.org/10.3390/ijms20020278>
- Fiorillo, L., Cervino, G., Laino, L., D'Amico, C., Mauceri, R., Tozum, T. F., Gaeta, M., & Cicciù, M. (2019). *Porphyromonas gingivalis*, Periodontal and Systemic Implications: A Systematic Review. *Dentistry journal*, 7(4), 114. <https://doi.org/10.3390/dj7040114>
- Fragkioudakis, I., Riggio, P., & D., Apatzidou. (2021). Understanding the microbial components of periodontal diseases and periodontal treatment-induced microbiological shifts. *Journal of medical microbiology*, 70(1), 10.1099/jmm.0.001247. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001247>

- García E., Avalos A., López J., García T., & J., Castro. (2021). Proangiogenic Effect of Affinin and an Ethanol Extract from *Heliopsis longipes* Roots: Ex Vivo and In Vivo Evidence. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(24), 7670. <https://doi.org/10.3390/molecules26247670>
- Jain N, Varma RB, Kumar JS, Kumaran P, Xavier AM. (2023). Antimicrobial activity of chlorhexidine on *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* isolated in children with early childhood caries – An in vitro study. *J Appl Pharm Sci*;13(02):113–116.
- Jiang, P., Li, Q., Liu, B., & Liang, W. (2023). Effect of cryoprotectant-induced intracellular ice formation and crystallinity on bacteria during cryopreservation. *Cryobiology*, 113, 104786. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104786>
- Laudenbach, J. M., & Kumar, S. S. (2020). Common Dental and Periodontal Diseases. *Dermatologic clinics*, 38(4), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.det.2020.05.002>
- Meyer, F., Enax, J., Epple, M., Amaechi, B. T., & Simader, B. (2021). Cariogenic Biofilms: Development, Properties, and Biomimetic Preventive Agents. *Dentistry journal*, 9(8), 88. <https://doi.org/10.3390/dj9080088>
- Moreno A., Morales P., Ribas D., Flores J., & A., Castaño-Seiquer, (2023). Analysis and Evaluation of Dental Caries in a Mexican Population: A Descriptive Transversal Study. *International journal of environmental research and public health*, 20(5), 3873. <https://doi.org/10.3390/ijerph20053873>
- Morrison, A. G., Sarkar, S., Umar, S., Lee, S. T. M., & Thomas, S. M. (2023). The Contribution of the Human Oral Microbiome to Oral Disease: A Review. *Microorganisms*, 11(2), 318. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020318>
- OMS. (2022). Global oral health status report: Towards universal health coverage for oral health by 2030. World Health Organization. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>
- Peretti P., Tavares E., Maia de Souza Junior B., R., Guitián E., Oliveira de Sousa F. & M., Pinheiro. (2021). Spilanthal content of *Acmella oleracea* subtypes and their bactericide and antibiofilm activities against *Streptococcus mutans*. *South African Journal of Botany*. Volume 143. Pages 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.001>.
- Spinozzi, E., Ferrati, M., Baldassarri, C., Cappellacci, L., Marmugi, M., Caselli, A., Benelli, G., Maggi, F., & Petrelli, R. (2022). A Review of the Chemistry and Biological Activities of *Acmella oleracea* ("jambù", Asteraceae), with a View to the Development of Bioinsecticides and Acaricides. *Plants* (Basel, Switzerland), 11(20), 2721. <https://doi.org/10.3390/plants11202721>
- SIVEPAB. (2021). Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales SIVEPAB 2021. Dirección General de Epidemiología. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-sivepab-2021>
- Wen, Z. T., Huang, X., Ellepola, K., Liao, S., & Li, Y. (2022). Lactobacilli and human dental caries: more than mechanical retention. *Microbiology* (Reading, England), 168(6), 001196. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001196>
- Xu, W., Zhou, W., Wang, H., & Liang, S. (2020). Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 120, 45–84. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>
- Yuan Q., Zhou C., Xie J., Zhang D., Zheng L., & Y., Li. (2020). Subgingival Microbes. In: Zhou, X., Li, Y. (eds) *Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7899-1_4
- Zhou X., Li Y., Peng X., Ren B., Li J., & Xu, X. (2020). Supragingival Microbes. In: Zhou, X., Li, Y. (eds) *Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7899-1_3



CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Objetivo	Actividades a realizar	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Obtener un suministro controlado y reproducible de bacterias cariogénicas y periodontopatógenas para llevar a cabo la formación de biopelículas.	Cultivo e identificación de <i>S. mutans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> y <i>P. intermedia</i> .							
Establecer condiciones experimentales adecuadas para la fiabilidad, validez y reproducibilidad en la formación <i>in vitro</i> de biopelículas cariogénicas y periodontales.	Determinación de las condiciones experimentales para la formación <i>in vitro</i> de biopelículas cariogénicas en superficies abióticas.							
	Determinación de las condiciones experimentales para la formación <i>in vitro</i> de biopelículas periodontales en superficies abióticas.							
Determinar la actividad antimicrobiana del extracto estandarizado de <i>H. longipes</i> en biopelículas cariogénicas y periodontales.	Determinación de la CMI del extracto estandarizado de <i>H. longipes</i> en la formación de biopelículas periodontales y cariogénicas.							
	Determinación de la CMB del extracto etanólico cuantificado de <i>H. longipes</i> en la formación de biopelículas periodontales y cariogénicas.							
	Elaboración y entrega del reporte final.							

Vo. Bo. de los asesores respecto al calendario de actividades

Dra. Susana Aurora Macín Cabrera (Núm. Eco. 17984)

Dr. Alejandro Palma Ramos (Núm. Eco. 15941)

Mtra. Valeria Espíndola Sotres (Cédula de Maestría 12776100)

ANEXOS

ANEXO 1. MÉTODOS UTILIZADOS

1.1 MÉTODO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR

Primero la campana debe estar despejada y encendida para evitar la acumulación de gases durante la limpieza. Con un paño limpio se limpian las superficies internas (mesa y paredes) iniciando desde el fondo hacia el frente para evitar contaminar áreas ya limpias. Se limpia primero con una solución de cloro al 15% durante 10 minutos, después con etanol al 70% y se esteriliza con luz UV durante 15 minutos. Este proceso se realiza antes y después de cada uso para garantizar las condiciones estériles cada que se trabaje en esa área.



Figura 11. Campana de flujo laminar limpia.

1.2 MÉTODO PARA LA ESTERILIZACIÓN DE SUERO DE CABALLO

Se utiliza un sistema de filtración previamente esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado el equipo se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual ha sido previamente limpiada con una solución de cloro al 15%, seguida de etanol al 70%, y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. El sistema de filtración se deberá

encontrar armado en la campana de flujo laminar y se conecta externamente a una bomba de vacío. A continuación, se hacen pasar 100 mL de suero de caballo a través de un filtro de membrana estéril con un tamaño de poro de 0.22 μm , con el objetivo de eliminar microorganismos y partícula contaminantes. La solución filtrada se recolecta en viales estériles, los cuales se sellan bajo condiciones asépticas y se almacenan a 4° C para su posterior uso.



Figura 12. Esterilización de suero de caballo mediante sistema de filtración al vacío.

1.3 MÉTODO DE PREPARACIÓN PARA SOLUCIONES ESTÉRILES DE VANCOMICINA Y BACITRACINA

Se utiliza un sistema de filtración previamente esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado el equipo, todo el procedimiento se realiza bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, seguida de etanol al 70%, y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. El sistema de filtración se arma dentro de la campana de flujo laminar y se conecta externamente a una bomba de vacío.

La preparación de las soluciones de los antibióticos fue la siguiente:

- a) Vancomicina: disolver 5 mg en 5 mL de agua destilada estéril.
- b) Bacitracina: disolver 75 mg en 3 mL de agua destilada estéril.

Las soluciones preparadas se filtran a través de un filtro de membrana estéril con un tamaño de poro de 0.22 μm , con el objetivo de eliminar microorganismos y partículas contaminantes. Las soluciones filtradas se almacenan en viales estériles, los cuales se sellan bajo condiciones asépticas y se almacenan a 4° C para su posterior uso.

1.4 MÉTODO DE PREPARACIÓN PARA SOLUCIÓN ESTÉRIL DE HEMINA-MENADIONA

Se utiliza un sistema de filtración previamente esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado el equipo, todo el procedimiento se realiza bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, seguida de etanol al 70%, y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. El sistema de filtración se arma dentro de la campana de flujo laminar y se conecta externamente a una bomba de vacío.

La preparación de las soluciones de hemina-menadiona fue la siguiente:

Menadiona: disolver 25 mg en 5 mL de etanol 96°.

Hemina: disolver 12.5 mg de hemina en 2.5 mL de NaOH 0.1 M.

Posteriormente ambas soluciones se vierten en 242.5 mL de agua destilada estéril. La solución final se filtra a través de un filtro de membrana estéril con un tamaño de poro de 0.45 μm , con el objetivo de eliminar microorganismos y partículas contaminantes. Las soluciones filtradas se almacenan en viales estériles, los cuales se sellan bajo condiciones asépticas y se almacenan a 4° C para su posterior uso.

1.5 MÉTODO PARA LA ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1.5.1 Método para medios de cultivo sólidos (agar):

1.5.1.1 Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI):

Disolver 52 g en un litro de agua destilada. Calentar en una parrilla con agitación constante hasta que la solución hierva durante 1 minuto y se logre una mezcla homogénea y sin turbidez.

Cubrir el matraz con tapón de algodón y gasa para evitar la contaminación manteniendo el intercambio de gases y sellarlo con un gorro de papel estraza.

A continuación, el medio se esteriliza en una autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado, se deja enfriar a temperatura ambiente y se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, etanol al 70% y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. Finalmente, verter el medio en cajas Petri estériles y dejar solidificar para su posterior uso en la inoculación de bacterias. Las cajas no inoculadas se almacenan en un refrigerador a 4° C.

1.5.1.2 Agar Man, Rogosa & Sharpe (MRS):

Disolver 70 g en un litro de agua destilada. Calentar en una parrilla con agitación constante hasta que la solución hierva durante 1 minuto y se logre una mezcla homogénea y sin turbidez. Cubrir el matraz con tapón de algodón y gasa para evitar la contaminación manteniendo el intercambio de gases y sellarlo con un gorro de papel estraza. A continuación, el medio se esteriliza en una autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado, se deja enfriar a temperatura ambiente y se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, etanol al 70% y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. Finalmente, verter el medio en cajas Petri estériles y dejar solidificar para su posterior uso en la inoculación de bacterias. Las cajas no inoculadas se almacenan en un refrigerador a 4° C.

1.5.1.3 Agar Soya Trypticasa Vancomicina-Bacitracina:

Disolver 40 g de agar y 1 g de extracto de levadura en un litro de agua destilada. Calentar en una parrilla con agitación constante hasta que la solución hierva durante 1 minuto y se logre una mezcla homogénea y sin turbidez. Cubrir el matraz con tapón de algodón y gasa para evitar la contaminación manteniendo el intercambio de gases y sellarlo con un gorro de papel estraza. A continuación, el medio se esteriliza en una autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado, se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, etanol al 70% y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. Cuando el medio se encuentre tibio se deberá añadir 100 mL de suero de

caballo estéril, 5 mL de solución vancomicina y 3 mL de solución bacitracina. Finalmente, verter el medio en cajas Petri estériles y dejar solidificar para su posterior uso en la inoculación de bacterias. Las cajas no inoculadas se almacenan en un refrigerador a 4° C.

1.5.1.4 Agar sangre

Disolver 40 g de agar en un litro de agua destilada. Calentar en una parrilla con agitación constante hasta que la solución hierva durante 1 minuto y se logre una mezcla homogénea y sin turbidez. Cubrir el matraz con tapón de algodón y gasa para evitar la contaminación manteniendo el intercambio de gases y sellarlo con un gorro de papel estraza. A continuación, el medio se esteriliza en una autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado, se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, etanol al 70% y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. Cuando el medio se encuentre tibio se deberá añadir 20 mL de sangre estéril y 12.5 mL de solución hemina-menadiona. Finalmente, verter el medio en cajas Petri estériles y dejar solidificar para su posterior uso en la inoculación de bacterias. Las cajas no inoculadas se almacenan en un refrigerador a 4° C.

1.5.2 Método para medios de cultivo líquidos:

1.5.2.1 Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI):

Disolver 37 g en un litro de agua destilada. Calentar en una parrilla con agitación constante hasta que la solución hierva durante 1 minuto y se logre una mezcla homogénea y sin turbidez. Cubrir el matraz con tapón de algodón y gasa para evitar la contaminación manteniendo el intercambio de gases y sellarlo con un gorro de papel estraza. A continuación, el medio se esteriliza en una autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado, se deja enfriar a temperatura ambiente y se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, etanol al 70% y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. Una vez frío el medio se procede a la inoculación y su incubación dependerá de las cepas inoculadas.

1.5.2.2 Caldo Man, Rogosa & Sharpe (MRS):

Disolver 51 g en un litro de agua destilada. Calentar en una parrilla con agitación constante hasta que la solución hierva durante 1 minuto y se logre una mezcla homogénea y sin turbidez. Cubrir el matraz con tapón de algodón y gasa para evitar la contaminación manteniendo el intercambio de gases y sellarlo con un gorro de papel estraza. A continuación, el medio se esteriliza en una autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado, se deja enfriar a temperatura ambiente y se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, etanol al 70% y esterilizada con luz UV durante 15 minutos.

1.5.2.3 Caldo Soya Trypticasa Vancomicina-Bacitracina:

Disolver 30 g del caldo y 1 g de extracto de levadura en un litro de agua destilada. Calentar en una parrilla con agitación constante hasta que la solución hierva durante 1 minuto y se logre una mezcla homogénea y sin turbidez. Cubrir el matraz con tapón de algodón y gasa para evitar la contaminación manteniendo el intercambio de gases y sellarlo con un gorro de papel estraza. A continuación, el medio se esteriliza en una autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado, se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, etanol al 70% y esterilizada con luz UV durante 15 minutos. Cuando el medio se encuentre tibio se deberá añadir 100 mL de suero de caballo estéril, 5 mL de solución vancomicina y 3 mL de solución bacitracina. Una vez frío el medio se procede a la inoculación y su incubación dependerá de las cepas inoculadas.

1.5.2.4 Caldo BHI enriquecido con sangre:

Disolver 37 g de caldo BHI en un litro de agua destilada. Calentar en una parrilla con agitación constante hasta que la solución hierva durante 1 minuto y se logre una mezcla homogénea y sin turbidez. Cubrir el matraz con tapón de algodón y gasa para evitar la contaminación manteniendo el intercambio de gases y sellarlo con un gorro de papel estraza. A continuación, el medio se esteriliza en una autoclave a 121° C durante 15 minutos a 22.5 psi. Una vez esterilizado, se deja enfriar a temperatura ambiente y se manipula bajo una campana de flujo laminar, la cual se limpió previamente con una solución de cloro al 15%, etanol al 70% y

esterilizada con luz UV durante 15 minutos. Cuando el medio se encuentre frío se deberá añadir 20 mL de sangre y 12.5 mL de solución hemina-menadiona. Posteriormente se procede a la inoculación y su incubación dependerá de las cepas inoculadas.

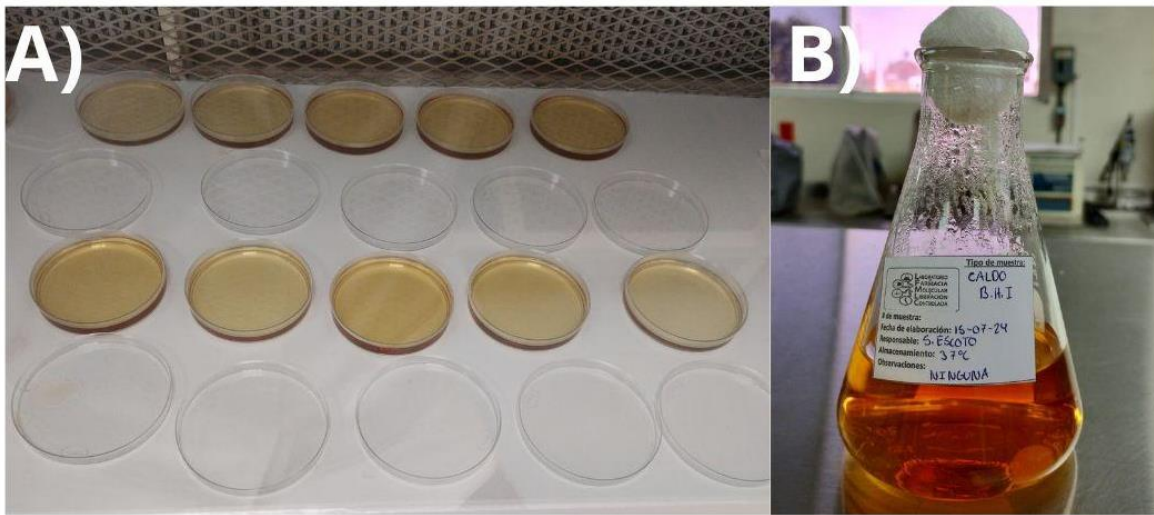


Figura 13. Imágenes tomadas a partir de la elaboración de medios de cultivo. A) Plaqueado de cajas Petri. B) Medio de cultivo líquido.

1.6 MÉTODO PARA FROTIS BACTERIANO

Se selecciona un portaobjetos el cual debe estar limpio y seco. Se coloca una gota de agua en el centro del portaobjetos. Después con un asa de inoculación estéril, se toma un pequeño inóculo bacteriano de un medio de cultivo. Si es una caja Petri, con el asa estéril se toma de una colonia aislada, si es un medio líquido, el asa se introduce al medio, se agita suavemente y se retira. Una vez que el asa tiene el inóculo se mezcla con la gota de agua y se extiende con la suspensión en una capa delgada y uniforme sobre el portaobjetos. El frotis se deja secar al aire y se fija al calentarlo ligeramente sobre una llama del mechero Bunsen durante unos pocos segundos. Finalmente, el frotis puede ser utilizado para la tinción de Gram.

1.6.1 Fijación con etanol para la preparación de frotis bacteriano

Se selecciona un portaobjetos el cual debe estar limpio y seco. Se coloca una gota de agua en el centro del portaobjetos. Después con un asa de inoculación estéril, se toma un pequeño inóculo bacteriano de un medio de cultivo. Si es una caja Petri, con el asa estéril se toma de una colonia aislada, si es un medio líquido, el asa se introduce al medio, se agita suavemente y se retira. Una vez que el asa tiene el inóculo se mezcla con la gota de agua y se extiende con la suspensión en una capa delgada y uniforme sobre el portaobjetos. Cuando el frotis se encuentre seco se añade etanol absoluto durante un minuto y se retira el exceso inclinando el cubreobjetos, dejándolo secar al aire. Finalmente, el frotis puede ser utilizado para la tinción de Gram.

1.7 MÉTODO PARA LA TINCIÓN DE GRAM

Una vez que el frotis bacteriano se encuentra fijado en el portaobjetos se inicia con la Tinción de Gram. Para ello se realiza lo siguiente: Se aplica el colorante cristal violeta durante un minuto para posteriormente enjuagarlo con agua mediante una pipeta Pasteur, después se añade el Lugol como mordiente durante otro minuto y se enjuaga con agua. El siguiente paso consiste en la decoloración con una solución de alcohol-acetona (50/50) durante unos 15 segundos y se enjuaga con agua. Posteriormente se contrasta con safranina durante unos 45 segundos y se enjuaga nuevamente con agua. Por último, se deja secar el portaobjetos a temperatura ambiente y una vez seco se observa bajo el microscopio.



Figura 14. Kit de tinción de Gram.

1.8 MÉTODO PARA LA ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL SUCIO

El proceso comienza con la carga del material sucio en el autoclave asegurándose de que los objetos estén colocados de manera que no se rompan o derramen su contenido durante el ciclo. Una vez que el autoclave está cargado se cierra herméticamente y se inicia el ciclo de esterilización. Se deja salir el aire frío a través de la válvula de presión para permitir la fase de calentamiento. Cuando se alcanzan las condiciones adecuadas, el autoclave comienza la fase de esterilización, operando a una presión de 22.5 psi y una temperatura de 121°C durante minutos. Tras completar el ciclo, el autoclave se apaga y se deja enfriar para evitar el riesgo de quemaduras. Una vez enfriado, se retiran los materiales esterilizados. El autoclave también se limpia y se vuelve a llenar con agua destilada para su próximo uso.

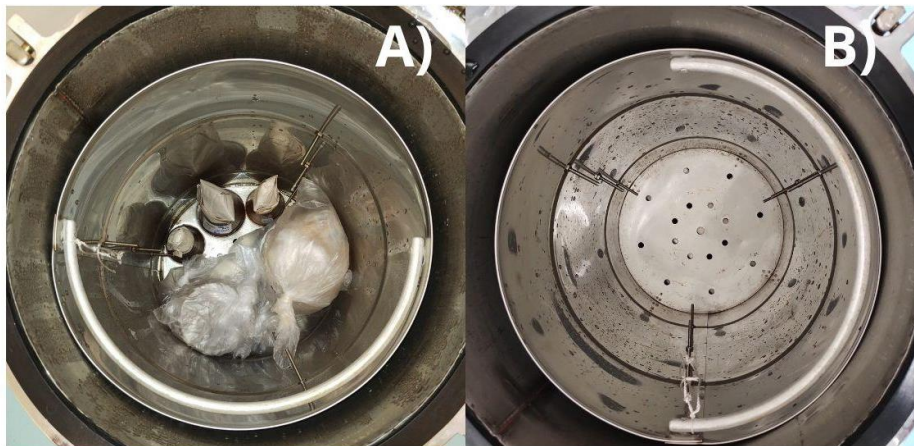


Figura 15. Esterilización de material sucio y limpieza del autoclave. A) Carga de material sucio. B) Autoclave limpio.

ANEXO 2. COMPENDIO DE MATERIALES, EQUIPOS Y EXCIPIENTES

Tabla 3. Lista de materiales, equipos y excipientes utilizados durante el desarrollo del presente proyecto.

MATERIALES	EQUIPOS	EXCIPIENTES
Pinzas.	Microscopio.	Suero de caballo.
Cajas Petri	Balanza analítica.	Agar y caldo BHI
Asas.	Parrilla de agitación y calentamiento.	Agar y caldo MRS
Pozos de Portaobjetos.	Campana de flujo laminar.	Agar y Caldo Soya Tripticasa
Cubreobjetos.	Estufa de incubación.	Agua destilada.
Kit de tinción de Gram.	Autoclave.	Agar y caldo sangre.
Jarras de anaerobiosis.	Refrigerador.	Solución hemina-menadiona
		Soluciones de vancomicina y bacitracina.
Desecador.		Sobres generadores de anaerobiosis
Matraces.		
Pipetas.		
Espátula.		
Agitador magnético.		
Papel estraza.		
Algodón y gasas.		
Mechero.		
Probeta.		
Velas.		
Micropipeta.		