



Aplicaciones de la microscopía de fuerza atómica en la investigación odontológica

Lidia López Jiménez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



TESIS DOCTORAL

Aplicaciones de la microscopía de fuerza atómica en la investigación odontológica

Programa de Doctorado de Biomedicina

Autor: Lidia López Jiménez

Directores: Miquel Viñas Ciordia y Teresa Vinuesa Aumedes

Barcelona, Septiembre 2014





Unidad de Microbiología
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Aplicaciones de la microscopía de fuerza atómica en la investigación odontológica

Programa de Doctorado de Biomedicina

Autor: Lidia López Jiménez

Directores: Miquel Viñas Ciordia y Teresa Vinuesa Aumedes

Barcelona, Septiembre 2014





Miguel Viñas Ciordia, Catedrático de Universidad y **Teresa Vinuesa Aumedes** Profesora Titular de Universidad, ambos del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la *Facultat de Medicina* de la *Universitat de Barcelona*,

CERTIFICAN,

Que la tesis doctoral presentada por LIDIA LÓPEZ JIMÉNEZ, se ha desarrollado en el laboratorio de Microbiología Molecular y Antimicrobianos de este departamento bajo nuestra supervisión.

Que el trabajo cumple a nuestro juicio los requerimientos formales y conceptuales necesarios para ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste firman el presente en *l'Hospitalet de Llobregat* el día 2 de Septiembre de 2014.

Prof. Dr. Miguel Viñas Ciordia

Dra. Teresa Vinuesa Aumedes

Lejos, muy lejos, allí donde brilla el Sol,
están mis mas altas aspiraciones.
Puede que hoy no las alcance,
pero puedo mirarlas y ver su belleza,
creer en ellas e intentar seguirlas allí donde me lleven.

Anónimo

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que en cierta manera han hecho posible la realización de esta tesis y han formado parte de mi vida científica y personal. A veces las palabras se pueden quedar cortas, pero con este escrito pretendo agradeceros todo lo que me habéis aportado.

Agrair al Dr. Miquel Viñas, director d'aquesta tesi, per oferir-me l'oportunitat d'introduir-me en el món de la recerca, per la immensa confiança que ha dipositat en mi des del primer moment, per tots els consells i ajut prestats a nivell professional, i per l'enorme suport a nivell personal en moments difícils, per transmetre'm la passió per la microbiologia i pels coneixements que he adquirit al seu costat durant tots aquests anys. També voldria agrair a la Dra. Teresa Vinuesa tota la seva ajut com a co-directora d'aquesta tesi, junt amb la seva confiança, afecte i preocupació tant a nivell professional com a nivell personal.

Al Dr. Josep Arnabat, per facilitar-me el material i coneixements necessaris per tal de poder realitzar part dels meus experiments.

Al Dr. José Pedro Martínez de la Universidad de Valencia por haberme cedido las cepas de *Candida albicans*, y a la Dra. Rosario Blanes por asesorarme y dedicarme su tiempo.

A tots els companys amb els que he tingut el plaer de treballar en aquest laboratori, voldria agrair molt afectuosament el vostre suport incondicional durant tots aquests anys i els moments inoblidables viscuts tant a dins com a fora del laboratori. M'heu animat quan la recerca m'ha deixat veure el seu cantó més amarg, i també m'heu acompanyat quan la ciència m'ha aportat felicitat. Especialment, agrair a l'Ester i la Lupe per ser les meves companyes eternes, per la vostra ajuda, les idees que m'heu aportat i per estar al meu costat. A la Lídia, el César, l'Anna, la Jana, la Kate, el Toni, la Carolina, l'Elena, la Valeria, la Indira, el Rida i la Betty, que heu format part de la

meva primera etapa i heu contribuït en el meu progrés. A l'Eva pel teu gran ajut en el laboratori. I als que heu format part de la meva última etapa, la Blanca, l'Eulalia, la Iraida, l'Erica, l'Hector, la Scarlette, la Marina, la Laura, la Rocío, la Lourdes i la Carme, agrair-vos la vostra paciència en els moments de crisi durant la redacció de la tesi i tot el suport. I a l'Àlex, companya inseparable en l'AFM, quants moments de desesperació que hem viscut, però sense tu no haguéssim arribat a on estem. Gràcies a tots per la vostra qualitat humana i el bon rotllo en el laboratori!

I would like to thank Prof. Dr. H. C. van der Mei for accepting me in the Department of Biomedical Engineering in Groningen to learn about force spectroscopy and giving me her whole support and trust. Specially thanks to Joob for his boundless patience and assistance in my experiments; technical staff for their help in the lab and taking care of me; and also to the lab people for giving me great ideas, for their affection and for making my stay in Groningen so fun and special.

Agrair també a tot el personal de l'administració del Campus de Bellvitge, la Rosaura, la Isabel G, la Isabel E, Carlos, Rosa, Pere, Mercè, Susanna, Maribel, David, la vostra ajuda, col·laboració i gran paciència.

A l'Aure, la Vanessa, i la Isabel de Podologia pel vostre afecte i preocupació tant a nivell professional com personal.

Muy especialmente, agradecer a mi familia vuestro amor incondicional, no tengo palabras para expresaros todo lo que significáis en mi vida. A mis padres, que han luchado y se han sacrificado para aportar lo indispensable a nuestras vidas, todo lo que soy os lo debo a vosotros. A mi hermana por ser una gran amiga, una segunda madre, y un pilar imprescindible en mi vida. A mi cuñaillo, por tu afecto, comprensión y apoyo, eres mi ejemplo a seguir en mi nueva etapa. Y a mi princesita Martina por ser mi fuente inagotable de felicidad y de alegría. Siempre habéis estado a mi lado

apoyándome en todos mis sueños, ayudándome a lograr todas mis metas y a ser mejor persona. Sois la luz de mi vida.

A Claudio, mi otra mitad, por tu gran apoyo incondicional, por intentar hacerme ver la vida desde otra perspectiva, por haberme aportado tanta energía y motivación, gracias por hacerme reír cuando el estrés me dominaba, por haber sido tan paciente conmigo, por tu buen criterio a la hora de aconsejarme y tu dedicación.

A l'Helena, hem compartit moltes experiències des de la universitat, durant la convivència i fins i tot en l'etapa de la tesi. Gràcies per plorar i riure amb mi, per la teva empatia i afecte, i per regalar-me la teva amistat.

Agrair a l'IDIBELL la concessió d'una beca predoctoral, i a la Universitat de Barcelona l'assignació d'una plaça de professor associat, que em van permetre realitzar els primers anys de tesi; posteriorment, la concessió d'una plaça d'ajudant a la Universitat de Barcelona m'ha permès finalitzar-la. Part dels aspectes experimentals han estat finançats gràcies a l'adjudicació de la beca ACESB10/11 (Programa de Recerca del Campus de Bellvitge). També agrair la concessió de l'ajut en el marc del Programa de formació per professorat amb contractació temporal (Universitat de Barcelona) que em va permetre realitzar una estada de 4 mesos al Department of Biomedical Engineering de University Medical Center Groningen de Groningen sota la supervisió de la Dra. H. C. van der Mei.

Por último agradecer a los que no he mencionado, amigos, familia y amigos que considero como familia, que han estado apoyándome cuando les he necesitado durante esta etapa.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	I
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VII
LISTA DE PUBLICACIONES	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Microscopía de Fuerza Atómica	1
1.1.1. Microscopio de fuerza atómica	2
1.1.2 <i>Cantilevers</i> y puntas	5
1.1.3. Modos de Operación	6
1.1.3.1. Modos para visualizar superficies	6
1.1.3.1.1. Modo de Contacto	7
1.1.3.1.2. Microscopía de Fuerza Lateral	9
1.1.3.1.3. Modo de No-Contacto	10
1.1.3.1.4. Modo de Contacto Intermitente o <i>Tapping</i>	11
1.1.3.2. Espectroscopía de Fuerza	12
1.1.3.2.1. Microscopía de Fuerza Química	16
1.1.3.2.2. Espectroscopía de Fuerza Molecular	16
1.1.3.2.3. Espectroscopía de Fuerza Celular	17
1.2. Terapia Fotodinámica	19
1.2.1. Infecciones de canales radiculares	19
1.2.2. Condiciones para infecciones persistentes	22
1.2.3. Tratamiento endodóntico	24
1.2.4. Terapias alternativas al tratamiento endodóntico convencional	27
1.2.4.1. Terapia con luz láser	27
1.2.4.2. Terapia Fotodinámica	30
1.3. Biofilm de <i>Candida albicans</i>	34
1.3.1. <i>Candida albicans</i>	35
1.3.2. Desarrollo y características del biofilm de <i>C. albicans</i>	36

Índice

1.3.2.1. Formación y desarrollo del biofilm	36
1.3.2.2. Modelos de biofilm de <i>C. albicans</i>	38
1.3.2.3. Características del crecimiento en biofilm de <i>C. albicans</i>	40
1.3.3. <i>C. albicans</i> y mutantes CFEM	43
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1. Cepas microbianas	47
3.2. Medios de cultivo	47
3.2.1. Caldo YPD	47
3.2.2. Agar YNB	48
3.2.3. Caldo de triptona y soja (TSB)	49
3.2.4. Agar de triptona y soja (TSA)	49
3.2.5. Medio RPMI-1640 con L-Glutamina sin bicarbonato sódico, tamponado con HEPES 25 mM	50
3.2.6. Medio de conservación	50
3.3. Soluciones utilizadas	51
3.3.1. Tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4	51
3.3.2. Tampón de adhesión de saliva	52
3.3.3. Solución de poli-L-lisina al 0.01 %	52
3.4. Visualización de muestras biológicas por microscopía de fuerza atómica	53
3.4.1. El microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM	54
3.5. Experimentos de espectroscopía de fuerza	55
3.5.1. El microscopio de fuerza atómica Dimension 3100 SPM	56
3.6. Productos de microscopía de fuerza atómica	57
3.6.1. Sustratos para muestras	57
3.6.2. <i>Cantilevers</i> y puntas	58
3.6.2.1. <i>Cantilevers</i> y puntas Modo no-contacto	58
3.6.2.2. <i>Cantilevers</i> y puntas Espectroscopía de fuerza	59

3.6.2.3. <i>Cantilevers</i> para la preparación de sondas celulares	60
3.7. Visualización de la superficie celular de las cepas de <i>C. albicans</i> por microscopía de fuerza atómica	61
3.7.1. Crecimiento en medio líquido YPD y preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica.	61
3.7.2. Condiciones y parámetros de visualización por microscopía de fuerza atómica.	61
3.7.3. Estudio de la rugosidad de la superficie celular de las cepas de <i>C. albicans</i> .	62
3.7.4. Análisis estadísticos.	62
3.8. Estudio de la formación y estructura del biofilm formado por las cepas de <i>C. albicans</i>	63
3.8.1. Biofilm sobre poliestireno	63
3.8.2. Biofilm sobre esmalte	64
3.8.3. Preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica	65
3.8.4. Condiciones y parámetros de visualización por microscopía de fuerza atómica	66
3.9. Análisis de la rugosidad del biofilm de <i>C. albicans</i> y sus mutantes CFEM	66
3.9.1. Biofilm sobre esmalte	67
3.9.2. Biofilm sobre Thermanox™	67
3.9.3. Preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica.	68
3.9.4. Condiciones y parámetros para el estudio de la rugosidad de superficie mediante microscopía de fuerza atómica	68
3.9.5. Análisis estadísticos	69
3.10. Estudio de la eficiencia del tratamiento con láser de ER,Cr:YSGG y con láser de Diodo	69
3.10.1. Láser de Er,Cr:YSGG	69

3.10.2. Láser de Diodo (por calor)	70
3.10.3. Tratamiento con láser de Er,Cr:YSGG y láser de Diodo de suspensiones celulares de <i>E. faecalis</i>	70
3.10.4. Visualización por microscopía de fuerza atómica	71
3.10.4.1. Preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica	71
3.10.4.2. Condiciones y parámetros de visualización por microscopía de fuerza atómica	72
3.10.5. Estudio de la rugosidad de superficie de <i>E. faecalis</i> tratados y no tratados	72
3.10.6. Análisis estadísticos	73
3.11. Estudio de la eficiencia del tratamiento con terapia fotodinámica	73
3.11.1. Luz LED (<i>Light-emitting-diode</i>) y azul de toluidina O	73
3.11.2. Láser de Diodo frío y azul de metileno	74
3.11.3. Preparación del sustrato para la formación de biofilm	74
3.11.4. Formación y obtención de biofilms de <i>E. faecalis</i>	75
3.11.5. Tratamiento fotodinámico de los biofilms obtenidos de <i>E. faecalis</i>	76
3.11.6. Visualización por microscopía de fuerza atómica	77
3.11.6.1. Preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica	77
3.11.6.2. Condiciones y parámetros de visualización por microscopía de fuerza atómica	77
3.11.7. Estudio de la rugosidad de superficie de biofilms de <i>E. faecalis</i> tratados y no tratados	78
3.11.8. Estudio de la viabilidad bacteriana en biofilms mediante CLSM	78
3.11.8.1. Preparación de las muestras	78
3.11.8.2. Condiciones y parámetros de visualización por CLSM	79

3.11.8.3. Enumeración de bacterias viables	80
3.11.9. Análisis estadísticos	80
3.12. Fuerzas de adhesión de <i>C. albicans</i> en Thermanox™ y hidroxiapatita	81
3.12.1. Condiciones de crecimiento y formación de biofilm	82
3.12.2. Materiales y recubrimiento con saliva	83
3.12.3. Preparación de las sondas celulares de AFM con <i>C. albicans</i>	83
3.12.4. Condiciones y parámetros para las medidas de fuerzas de adhesión	84
3.12.5. Estudio de la rugosidad de superficie de materiales	86
3.12.6. Análisis estadísticos	86
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
4.1. Estudio de la eficiencia del tratamiento con láser ER,CR:YSGG y con láser Diodo	90
4.2. Estudio de la eficiencia del tratamiento con terapia fotodinámica	100
4.3. Caracterización de la superficie celular de <i>C. albicans</i> y mutantes CFEM	110
4.4 Estudio de la formación y estructura del biofilm formado por <i>C. albicans</i>	114
4.5 Influencia del sustrato en la formación del biofilm en <i>C. albicans</i>	117
4.6. Fuerzas de adhesión del biofilm de <i>C. albicans</i> y mutantes CFEM	125
5. CONCLUSIONES	135
6. BIBLIOGRAFÍA	139
7. PUBLICACIONES	157

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

10x	Diez veces concentrado
AFM	Microscopía / Microscopio de fuerza atómica
CFM	Microscopía de fuerza química
cm ²	Centímetros cuadrados
CLSM	Microscopía confocal láser de barrido
ERCR	Láser de Er,Cr:YSGG
ESM	Esmalte
HAP	Hidroxiapatita
Hz	Hercios
J	Julios
kHz	Kilohercios (10 ³ hercios)
m	Metros
MB	Azul de metileno
mg	Miligramos (10 ⁻³ gramos)
min	Minutos
mJ	Milijulios (10 ⁻³ julios)
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar (M/1000)
ms	Milisegundos (10 ⁻³ segundos)
mW	Milivatios (10 ⁻³ vatios)
N	Newtons
nm	Nanómetros (10 ⁻⁹ metros)
nN	Nanonewtons (10 ⁻⁹ newtons)
°C	Grados Celsius
PDT	Terapia Fotodinámica
pH	$\log 1/(H^+) = -\log [H^+]$
PSPD	Detector fotodiodo

Símbolos y abreviaturas

R_a	Rugosidad media de superficie
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SALV	Saliva
SCFS	Espectroscopía de fuerza celular
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SMFS	Espectroscopía de fuerza molecular
TBO	Azul de toluidina O
THX	Thermanox™
Ufc	Unidades formadoras de colonia
v/v	Volumen por volumen
W	Vatios
μg	Microgramo (10^{-6} gramos)
μl	Microlitro (10^{-6} litros)
μm	Micrómetros (10^{-6} metros)
μm^2	Micrómetros cuadrados
μM	Concentración micromolar (10^{-6} moles)
μs	Microsegundos (10^{-6} segundos)

LISTA DE PUBLICACIONES

El período de duración del trabajo experimental de esta tesis ha permitido la participación en varios proyectos de investigación, cuya producción se puede ver en los siguientes documentos:

Pons-Vicente O, López-Jiménez L, Sánchez-Garcés M.A, Sala-Pérez S, Gay-Escoda C A comparative study between two different suture materials in oral implantology. *Clinical Oral Implants Research* 2011;22:282-8

Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, D Ostuni V, Fusté E, Vinuesa T, Viñas M A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Microbiology* 2011;14:51-58

Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas M Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011;38:398-402

Fusté E, López-Jiménez L, Segura C, Gainza E, Vinuesa T, Viñas M Carbapenem resistance mechanisms of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology* 2013;62:1317-1325

Etxeberria M, López-Jiménez L, Merlos A, Escuín T, Viñas M Bacterial adhesion efficiency on implant abutments: A comparative study. *International Microbiology* 2013;16: 235-242

López-Jiménez L, Arnabat-Dominguez J, Vinuesa T, Viñas M Atomic Force Microscopy visualization of injuries in *Enterococcus faecalis* surface caused by Er,Cr:YSGG and Diode Lasers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014 (*Accepted*)

López-Jiménez L, Fusté E, Martinez-Garriga B, Arnabat-Dominguez J, Vinuesa T, Vinas M Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms (*Submitted to Lasers in Medical Science*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microscopía de Fuerza Atómica

El desarrollo del microscopio óptico aportó nuevos avances en el conocimiento del mundo biológico, permitiendo la observación de tejidos, células individuales y algunos orgánulos celulares, con un máximo de resolución de unos 200 nm. Posteriormente, con el desarrollo del microscopio electrónico se incrementó la resolución hasta 1 nm, pudiéndose así observar componentes sub-celulares como proteínas o viriones [1].

A principios de la década de los 80, Binnig & Rohrer [2] revolucionaron el mundo de la microscopía con la invención del “microscopio de efecto túnel” (STM), el primero de un amplio grupo de recursos técnicos conocido como “microscopía de sonda” (SPM). La técnica del STM está basada en el efecto túnel, cuando una sonda conductora se halla a una cierta distancia de la superficie de una muestra conductora se crea una corriente de electrones entre ambas superficies, la cual es detectada por el microscopio a medida que se va rastreando línea a línea la superficie de la muestra. De este modo, el STM nos proporciona una imagen topográfica a escala atómica de la superficie y permite el estudio de las propiedades eléctricas de la muestra.

La técnica del STM tiene una limitación derivada de que no es aplicable al estudio de materiales no conductores. Esta limitación se solventó años más tarde con el desarrollo del “microscopio de fuerza atómica” (AFM) [3], abriendo nuevas posibilidades para el estudio de muestras biológicas. La técnica del AFM es muy similar al STM, el

principio de su funcionamiento es detectar las fuerzas de interacción entre los átomos de una punta y los átomos de la superficie de la muestra, utilizando unas sondas especiales que consisten en una fina punta de peso ínfimo acopladas a una palanca o *cantilever* elástico. La microscopía de fuerza atómica permite obtener información sobre las propiedades mecánicas, la hidrofobicidad y la viscoelasticidad de la superficie de muestras biológicas a tiempo real, bajo diversas condiciones fisiológicas (ambiente seco o ambiente líquido), y sin la necesidad de una previa preparación especial o tinción [4].

1.1.1. Microscopio de fuerza atómica

El Microscopio de fuerza atómica (AFM) estudia la estructura de la superficie de las muestras midiendo las fuerzas de interacción entre los átomos de esta superficie y los átomos de una punta acoplada en el extremo de una palanca flexible o *cantilever*. Como resultado de esta interacción y dependiendo de la distancia entre la punta y la superficie de la muestra, los átomos estarán sujetos a fuerzas de naturaleza atractiva o repulsiva, las cuales están representadas en la figura 1.1, donde podemos observar que se definen dos áreas según la distancia, área de contacto y área de no-contacto. En el área de contacto, la distancia entre la punta y la superficie de la muestra es de unos pocos angstroms (Å) y las fuerzas que actúan entre los átomos son fuerzas de repulsión electrostáticas. En el área de no-contacto, en la que la distancia es relativamente mayor (del orden de unos 10 a 100 Å), las fuerzas interatómicas son de naturaleza atractiva como resultado de las fuerzas de Van der Waals de largo alcance [5]. El microscopio de fuerza atómica puede operar en varios modos según

la distancia entre la punta y la muestra, que se describen en el apartado 1.1.3.

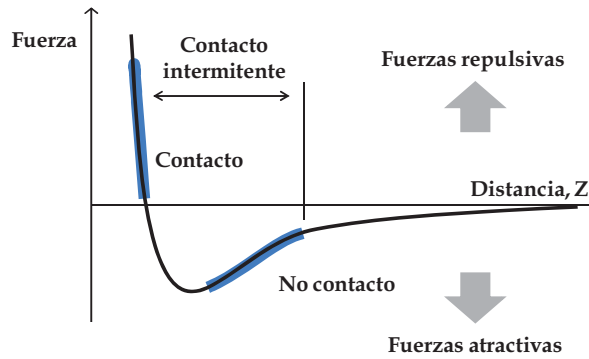


Figura 1.1 Curva de fuerzas interatómicas *versus* distancia.

A medida que se va rastreando la superficie línea a línea, las fuerzas de interacción entre átomos provocan una flexión del *cantilever* que puede ser detectada por el AFM mediante el “sistema de detección óptico de desviación del *cantilever*” [6, 7], ilustrado en la figura 1.2. De este modo, es posible evaluar las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie midiendo las pequeñas desviaciones del *cantilever*.

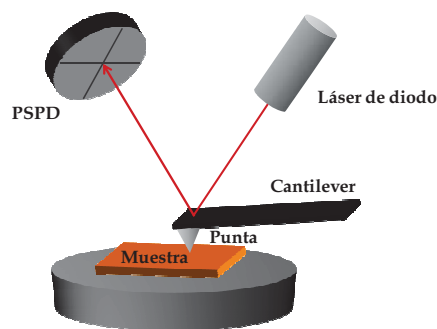


Figura 1.2 Sistema de detección óptico de desviación del *cantilever*.

El sistema de detección de la desviación del cantilever mediante una luz láser, es el método de detección más utilizado en los equipos de AFM actuales, además de ser el método más simple, económico y versátil que existe. Una luz láser incide directamente sobre el *cantilever* por la cara opuesta a la de la punta, y es reflejada al centro de un detector fotodiodo dividido en cuatro secciones denominado *Position-Sensitive Photo Detector (PSPD)*. Debido a cambios en la superficie de la muestra, se producen doblamientos del *cantilever* que provocan cambios en el ángulo de la reflexión del láser en el PSPD, lo cual se traduce en cambios en la intensidad de la luz del láser reflejada. Esta diferencia de intensidad se transforma en una señal eléctrica con la que se puede cuantificar tanto los movimientos verticales de la punta, debido a las fuerzas de atracción o de repulsión, como los movimientos laterales y de torsión del *cantilever* como consecuencia de la interacción entre la punta y la superficie de la muestra [5].

Al mismo tiempo, a través de un circuito de retroalimentación se controlan los movimientos de la punta y de la muestra durante el rastreo gracias a un sistema de tubos piezoeléctricos. Este mecanismo se basa en el efecto piezoeléctrico de ciertos materiales, como la cerámica, que se contraen o expanden en respuesta al voltaje aplicado. Aplicando una señal eléctrica se consigue una elongación de dimensiones atómicas de los materiales piezoeléctricos y, por tanto de la muestra a visualizar. Así el movimiento de la muestra y de la punta en los tres planos del espacio viene controlado eléctricamente por tubos piezoeléctricos [8]. La retroalimentación entre el sistema de tubos piezoeléctricos y el sistema de detección óptico de la desviación

del *cantilever* permite un control preciso de los movimientos de la punta y un rastreo a escala atómica de la superficie de la muestra.

El sistema de control es de vital importancia para el funcionamiento del AFM. Mediante un procesador de señales (integrado en una controladora) se convierten las señales eléctricas del cabezal del microscopio en datos que podrán ser analizados por un programa informático. A su vez, todos los parámetros introducidos en este programa serán convertidos en señales eléctricas, con el fin de poder ordenar los movimientos del sistema de escáner (tubos piezoeléctricos). Los datos obtenidos son procesados y transformados en imagen. De este modo, el AFM permite obtener información no solo de la topografía de la muestra, sino también de sus propiedades mecánicas y viscoelásticas [5].

1.1.2 *Cantilevers* y puntas

La nanopunta acoplada a un *cantilever* es la esencia del AFM, puesto que es la parte que interactúa con la superficie de la muestra. El conjunto punta-*cantilever* puede estar hecho de silicio, nitruro de silicio o diamante, y recubierto con otro material para incrementar la reflexión de la luz láser [5]. Los parámetros de la punta a tener en cuenta son el radio de curvatura del ápice de la punta y la relación altura-anchura (figura 1.3a). De esta manera, las puntas que se comercializan pueden llegar a ser en forma piramidal, tetragonal o cónica, y tener un radio de curvatura del ápice de 1 a 20 nm.

La geometría de los *cantilevers* (si son triangulares o rectangulares), junto con su longitud, anchura y grosor, determinan las propiedades mecánicas del *cantilever*, que a su vez están relacionadas con la constante elástica (k) y la frecuencia de resonancia (figura 1.3b). Los *cantilevers* flexibles y con una baja frecuencia de resonancia, son ideales para medir en líquidos, en modo operativo de contacto y en espectroscopía de fuerza. En cambio, aquellos *cantilevers* más rígidos y de mayor frecuencia de resonancia son más apropiados para medir en aire y en modo de no-contacto [9].

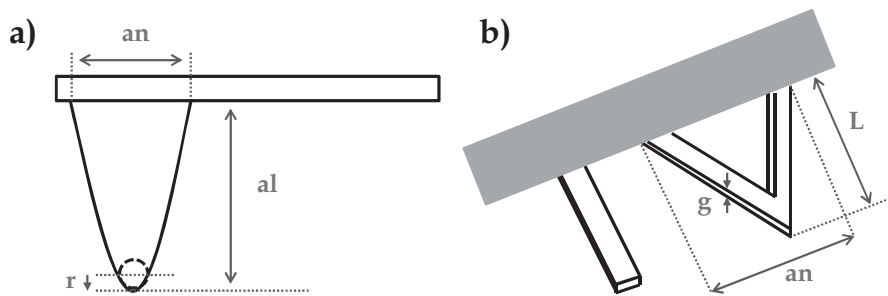


Figura 1.3 Parámetros esenciales de las puntas y *cantilevers*, geometrías de los *cantilevers*. a) Punta: radio de curvatura del ápice (r) y la relación altura-anchura (al). b) *Cantilever*: anchura (an), longitud (L) y grosor (g).

1.1.3. Modos de Operación

1.1.3.1. Modos para visualizar superficies

Existen varios modos de operación en el AFM para adquirir imágenes (figura 1.4), dependiendo de la naturaleza de las fuerzas de interacción entre átomos según la distancia entre la punta y la

superficie de la muestra, las cuales se han comentado en apartados anteriores (figura 1.1).

1.1.3.1.1. Modo de Contacto

En el modo de contacto, se produce un “contacto real” entre la punta y la superficie de la muestra donde las fuerzas que predominan son de naturaleza repulsiva, que tienden a separar la punta provocando una desviación del *cantilever*. En este punto, también existen otros dos tipos de fuerzas que mantienen la punta en contacto con la muestra, la fuerza de capilaridad y la fuerza que ejerce el propio *cantilever* sobre la muestra. Cuando se trabaja en medio seco, la fuerza de capilaridad viene dada por la presencia, en algunos casos, de una fina capa de agua que cubre la superficie de la muestra, y su magnitud dependerá de la distancia entre la punta y la muestra. La fuerza ejercida por el propio *cantilever* es como la de un muelle comprimido, y depende de la desviación del *cantilever* y su constante elástica. El AFM es capaz de detectar los pequeños cambios en la desviación del *cantilever* como resultado de las fuerzas de interacción a medida que se rastrea la superficie de la muestra.

En el modo de contacto es posible trabajar a fuerza constante o a distancia constante. A modo de fuerza constante, la desviación del *cantilever* durante el rastreo de la superficie es utilizada por el circuito de retroalimentación para controlar el movimiento del Z-escáner piezoeléctrico, adaptándolo a los cambios topográficos de la muestra, y poder mantener constante tanto la desviación del *cantilever* como la fuerza que se le aplica a la muestra durante el rastreo. El movimiento

del Z-escáner piezoeléctrico es proporcional a la topografía de la muestra. La velocidad de rastreo es lenta debido al tiempo de respuesta del circuito de retroalimentación.

A modo de distancia constante, el Z-escáner piezoeléctrico se mantiene a una distancia constante de la muestra debido a que el control de retroalimentación está desconectado. En este caso, la desviación del *cantilever* es proporcional a la interacción de las fuerzas durante el rastreo. El modo de contacto a distancia constante es utilizado para la visualización de superficies planas y permite una elevada velocidad de rastreo.

El tipo de imágenes que se pueden obtener utilizando el modo de contacto son [10]:

- Imágenes de altura: La desviación del *cantilever* durante el rastreo de la superficie queda registrada y es la expresión de la topografía de la muestra.
- Imágenes de desviación: El circuito de retroalimentación mantiene constante la desviación del *cantilever* durante el rastreo controlando el movimiento del Z-escáner piezoeléctrico. Debido a que el tiempo de respuesta del circuito es lento, se producen pequeñas desviaciones del *cantilever*, este error de señal es utilizado para generar las imágenes de desviación, las cuales muestran con mayor sensibilidad los finos detalles de la superficie.

Los *cantilevers* comúnmente utilizados en el modo de contacto son más flexibles, con una constante elástica de alrededor de 1 N/m. Este tipo de *cantilevers* son extremadamente sensibles a pequeños cambios en las fuerzas de interacción, permitiendo al AFM representar estructuras a escala atómica. Una desventaja que presenta este modo de operación debido a la fuerza que se ejerce sobre la superficie, es que tanto la punta como la muestra pueden dañarse durante el rastreo, por lo que no es muy apropiado para visualizar muestras biológicas.

1.1.3.1.2. Microscopía de Fuerza Lateral

Una variación del modo de contacto es la microscopía de Fuerza Lateral, que registra el movimiento de torsión del cantilever durante el rastreo de la superficie de la muestra, a través del movimiento horizontal de la luz láser reflejada en el PSPD [11]. La magnitud de la desviación lateral del *cantilever* viene determinada por el coeficiente de fricción (μ), la topografía de la superficie de la muestra, la dirección del movimiento del *cantilever* y la constante elástica lateral del *cantilever*. Los *cantilevers* que se utilizan son de las mismas características que en el modo de contacto, permitiendo la cuantificación del grado de fricción superficial entre la punta y la muestra [12].

Las imágenes que se generan en la microscopía de Fuerza Lateral nos aportan información de la topografía de la muestra y de sus diferentes propiedades de fricción [13].

1.1.3.1.3. Modo de No-Contacto

En el modo de no-contacto, la punta se encuentra a una distancia próxima a la superficie de la muestra, donde las fuerzas de interacción dominantes entre átomos son las fuerzas de Van der Waals de naturaleza atractiva. La fuerza que ejerce la punta sobre la muestra es muy débil, evitando así un rápido deterioro de la muestra o de la punta, por lo tanto este modo de operación es más apropiado y ampliamente utilizado para visualizar y estudiar muestras biológicas.

El sistema hace vibrar mecánicamente al *cantilever* cerca de su frecuencia de resonancia (frecuencia intrínseca del *cantilever*) registrando la amplitud de la vibración. Los *cantilevers* utilizados son rígidos, con una frecuencia de resonancia entre 100 kHz y 400 kHz, una amplitud de oscilación menor a 10 nm, y una constante elástica alrededor de 40 N/m. El sistema monitoriza la amplitud de la vibración del *cantilever* durante el rastreo por la superficie de la muestra, y la mantiene constante a través del circuito de retroalimentación que controla los movimientos del Z-escáner piezoeléctrico, adaptándolos a la topografía de la muestra. Los movimientos del Z-escáner piezoeléctrico son los que se utilizan para reflejar los datos de la topografía de la muestra [14].

Los tipos de imágenes que se generan en el modo de no-contacto son:

- Imágenes de altura: Proporcionan información de la topografía de la superficie utilizando los movimientos del Z-escáner piezoeléctrico.

- Imágenes de amplitud: El circuito de retroalimentación no es perfecto y su respuesta en mantener la amplitud constante es lenta. Durante el rastreo se producen pequeños cambios que alteran la constancia en la amplitud de oscilación del *cantilever* y quedan registrados como error de señal. En este tipo de imágenes se acentúan las finas estructuras de la superficie a expensas de la información general de topografía [15].

- Imágenes de fase: Las variaciones producidas en la fase de oscilación del *cantilever* proporcionan información de la composición de la muestra, así como de sus propiedades elásticas, viscoelásticas y de adhesión [16].

1.1.3.1.4. Modo de Contacto Intermitente o *Tapping*

Similar a lo que ocurre en el modo de no-contacto, se hace vibrar externamente el *cantilever* cerca de su frecuencia de resonancia. La amplitud de esta oscilación es mayor que en el modo de operación anterior, aproximadamente de 100 nm, llegando la punta a entrar en contacto intermitente con la muestra durante el rastreo de su superficie [5, 17]. Por lo tanto, cada vez que la punta se aproxima a la muestra las fuerzas de interacción interatómicas dominantes son las fuerzas de repulsión. Durante el rastreo se producen cambios en la amplitud de oscilación del *cantilever*, y pequeñas diferencias o largos retardos en la fase de oscilación, lo que permite obtener información sobre la topografía de la superficie y de las propiedades mecánicas de la muestra [1]. En el modo de contacto intermitente se generan el

mismo tipo de imágenes que en el modo de no-contacto, explicado en el apartado 1.1.3.1.3.

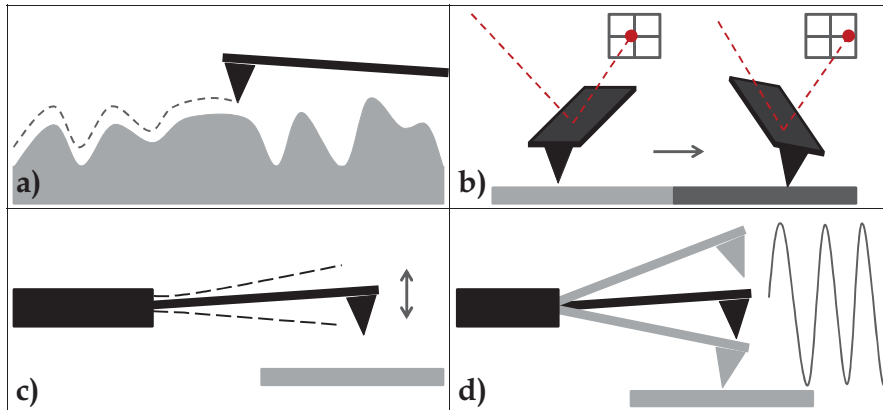


Figura 1.4 Modos de obtención de imágenes en AFM. a) Modo de contacto. b) Microscopía de fuerza lateral. c) Modo de no-contacto. d) Modo de contacto intermitente.

1.1.3.2. Espectroscopía de Fuerza

La microscopía de fuerza atómica permite obtener imágenes de estructuras y muestras biológicas a escala nanométrica con una elevada resolución. No obstante, esta técnica es también de gran utilidad para medir las fuerzas de interacción y estudiar las propiedades físicas de muestras biológicas, mediante la adquisición de curvas de fuerza-distancia utilizando el modo de operación conocido como Espectroscopía de Fuerza, una habilidad exclusiva de la microscopía de fuerza atómica [18].

Los modos de obtención de imágenes utilizan la interacción de las fuerzas entre la superficie de la muestra y la punta para rastrear la

muestra, y así obtener información de la topografía y de las características de la superficie. En el modo de espectroscopía de fuerza, se mide la desviación del cantilever durante su movimiento vertical de aproximación y retracción a la muestra (dado por el Z-escáner piezoeléctrico) para cuantificar y caracterizar las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra. Durante la aproximación y retracción se produce un doblamiento del cantilever como resultado de las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie de la muestra, el cual es registrado por el PSPD como un cambio de voltaje o un cambio en la intensidad de la luz láser reflejada por el *cantilever*. Esta diferencia de intensidad es traducida por el PSPD como una desviación del *cantilever* (d). Mediante la ley de Hooke, la desviación del *cantilever* es transformada en unidad de fuerza (F), donde k es la constante elástica del *cantilever*:

$$F = -kd$$

El resultado es la obtención de una curva de fuerza-distancia, a partir de la cual se puede extraer información sobre las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de una muestra, como la viscoelasticidad, fuerzas de adhesión y fuerzas de superficie [18, 19]. En la figura 1.5 se muestra un esquema de una curva de fuerza-distancia obtenida mediante espectroscopía de fuerza.

Observando el esquema, en la zona de no-contacto (zona A), el Z-escáner piezoeléctrico empieza su recorrido hacia abajo, aproximando la punta a la muestra, en este punto la deformación del *cantilever* es 0.

Las fuerzas atractivas de van der Waals ejercen una presión sobre el *cantilever* que va aumentando a medida que la distancia entre la punta y la muestra se reduce. Cuando esta presión es mayor a la constante elástica se produce una deformación negativa del *cantilever*, seguida del contacto entre la punta y la muestra (zona B). Tras producirse el contacto, mientras el Z-escáner piezoeléctrico continúa su extensión, las fuerzas de repulsión provocan una deformación del *cantilever* en sentido opuesto (zona C). Esta fase de la curva de fuerza-distancia (A→C) se denomina fase de aproximación y aporta información de las fuerzas de superficie y de las propiedades mecánicas de la muestra. En la fase de retracción (D→E), el Z-escáner piezoeléctrico va retrocediendo. La punta sigue adherida a la muestra provocando una fuerte deformación del *cantilever* en sentido opuesto al movimiento del escáner (zona E), hasta que se separa completamente de la superficie de la muestra volviendo a 0 la deformación del *cantilever* [18-20].

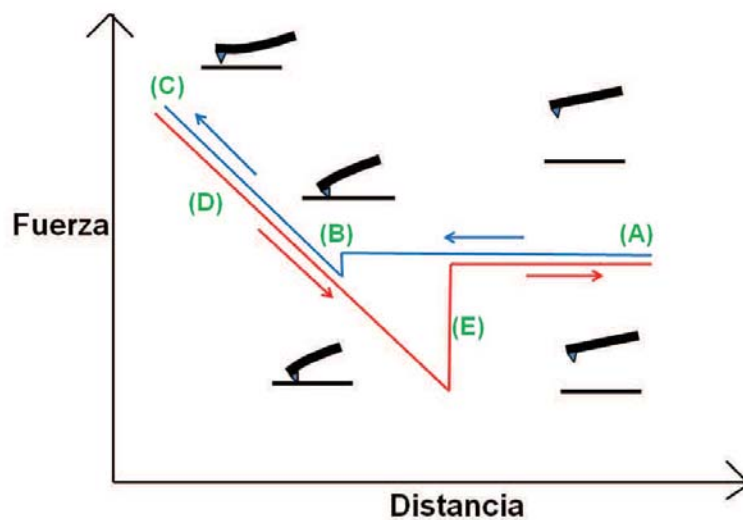


Figura 1.5 Curva de fuerza-distancia

Las características de esta completa separación o rotura de la interacción entre la punta y la muestra, son utilizadas para medir la intensidad de las fuerzas de adhesión entre ambas partes, o también fuerzas de unión entre biomoléculas complementarias [16].

La espectroscopía de fuerza permite trabajar con tres modos de medida de fuerza diferentes (figura 1.6):

- Microscopía de fuerza química (CFM): Desde su primera aplicación ha proporcionado información sobre la distribución espacial de grupos químicos en células vivas [21].
- Espectroscopía de fuerza molecular (SMFS): Aporta información de la interacción ligando-receptor [22].
- Espectroscopía de fuerza celular (SCFS): Permite conocer las fuerzas de interacción entre una célula y diversos tipos de sustratos, o las fuerzas de adhesión entre células [23, 24].

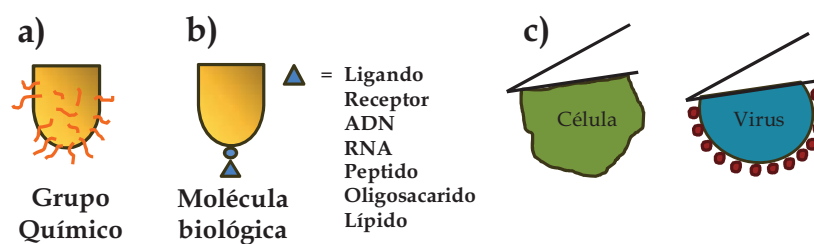


Figura 1.6 Sondas de Espectroscopía de Fuerza: a) CFM, puntas funcionalizadas con grupos químicos; b) SMFS, puntas funcionalizadas con moléculas; c) SCFS, cantilevers funcionalizados con células o virus.

1.1.3.2.1. Microscopía de Fuerza Química

La Microscopía de Fuerza Química es una poderosa técnica que, mediante la funcionalización de puntas con grupos químicos, ha permitido la obtención de un mapa espacial de la superficie de células vivas con la distribución de grupos químicos y de sus interacciones sobre varias superficies [23]. Se puede estudiar y caracterizar la estructura y las propiedades físico-químicas de las superficies microbianas a nivel molecular; explorar la estructura funcional de la superficie celular, la hidrofobicidad y cargas superficiales; y conocer cómo interactúan drogas antimicrobianas con las diferentes superficies bacterianas[14, 25, 26].

1.1.3.2.2. Espectroscopía de Fuerza Molecular

La espectroscopía de fuerza molecular es una técnica novedosa que permite estudiar a nivel molecular los sistemas microbianos y su interacción con el ambiente [27, 28]. Consiste en funcionalizar la punta de AFM con una molécula específica y hacerla interactuar con una molécula complementaria en una superficie celular o en un sustrato, monitorizando a tiempo real la fuerza necesaria para romper esta unión [29]. Ejemplos de esta interacción específica entre moléculas sería la unión antígeno-anticuerpo, la unión entre proteínas de adhesión celular [16], o la interacción ligando-receptor [30, 31].

Mediante la técnica de SMFS varios grupos de investigadores han podido caracterizar la integración y conformación de una proteína en una membrana celular [32]; así como explorar la adhesión y la

elasticidad a nivel molecular [33, 34]; estudiar las interacciones moleculares de diferentes tipos de moléculas como oligosacáridos, ácidos nucleicos, proteínas [35, 36], o las propiedades mecánicas de moléculas de adhesión [37], y conocer la organización nativa del peptidoglicano en las paredes celulares bacterianas [38].

Una limitación que presenta la técnica SMFS es que las moléculas, sean de la naturaleza que sean, utilizadas para funcionalizar las puntas, son extraídas y purificadas de su contexto biológico, como consecuencia no hay una regulación de su función ni un control de su estructura o conformación nativa. Este inconveniente puede ser sorteado utilizando estas moléculas dentro de su contexto biológico utilizando puntas funcionalizadas con células vivas [39].

1.1.3.2.3. Espectroscopía de Fuerza Celular

La adhesión celular es un mecanismo que está implicado en el desarrollo embrionario, la formación de tejidos, la comunicación, transporte y migración celular, metástasis de tumores, reconocimiento celular, colonización bacteriana, infecciones bacterianas y virales [40-43]. Debido a su implicación en varios procesos biológicos, es de gran interés conocer y estudiar el mecanismo de adhesión celular tanto a nivel molecular como a nivel celular.

Mediante la inmovilización de células a un *cantilever* se obtiene una “sonda celular” que permite cuantificar las fuerzas de interacción con otras células o sustratos. Esta técnica aporta nuevas oportunidades para investigar las bases moleculares de los procesos de adhesión

celular importantes en la formación de biofilm, procesos de infección y interacción entre células [24]. Tal y como ha sido descrito en la literatura, variando el tiempo de contacto entre la sonda celular y las otras células o sustratos, se pueden cuantificar las propiedades de adhesión y las uniones entre moléculas o entre células. La intensidad de la adhesión incrementa con el tiempo de contacto y con el área de contacto [44].

La técnica de SCFS ofrece un amplio rango de medición de fuerzas de interacción desde 10 pN hasta 10^6 pN. Con esta sensibilidad, permite estudiar a fondo los fenómenos de adhesión celular y reconocimiento molecular entre células midiendo y cuantificando las interacciones no específicas, relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de las células y las superficies de sustratos [45]; y las interacciones específicas como fuerzas de adhesión molecular, reconocimiento específico y unión entre proteínas. Las curvas de fuerza-distancia se obtienen después de haber mantenido en contacto la sonda celular con otra célula o sustrato durante un tiempo de adhesión concreto y ejerciendo una determinada fuerza. Analizando la curva resultante, la fuerza necesaria para separar las dos células o las dos superficies se describe como la fuerza de adhesión de la célula [44].

La aplicación de la técnica SCFS ha permitido a un amplio número de investigadores estudiar las fuerzas de adhesión y los procesos de regulación de dicha adhesión, tanto a nivel molecular [46] como a nivel celular [47]; estudiar la adhesión bacteriana a diferentes tipos de superficies de biomateriales [48], superficies hidrófobas, hidrófilas o

recubiertas con proteínas [49–51]; medir la interacción bacteria-sustrato bajo condiciones aerobias y anaerobias [52]; o estudiar la asociación entre especies microbianas midiendo las fuerzas de adhesión entre células [53, 54].

1.2. Terapia Fotodinámica

1.2.1. Infecciones de canales radiculares

La microbiota de la cavidad oral puede estar formada por más de 500 especies diferentes de microorganismos [55]. Algunas de las patologías de la cavidad oral están relacionadas con procesos infecciosos como caries, periodontitis, infecciones de los canales radiculares, abscesos, etc. Las infecciones de los canales radiculares son producidas cuando un daño en la estructura del esmalte o del cemento facilita la entrada de microorganismos al interior de la cavidad pulpar y favorece la colonización de los canales radiculares. Si no se elimina completamente la presencia de microorganismos en esta zona, la reacción inflamatoria puede llegar a afectar a los tejidos del periápice y originar una periodontitis apical [56].

Los microorganismos pueden habitar tanto en el canal radicular principal como en los túbulos dentinarios o en las ramificaciones, formando una estructura compleja denominada biofilm en la que las células están integradas en una matriz extracelular protegidas de las condiciones ambientales [57]. Este factor junto con la localización anatómica de los canales radiculares, favorece que los

microorganismos puedan escapar del sistema inmune del huésped y de la acción de antimicrobianos administrados de manera sistémica [58]. Con el fin de entender el proceso de esta infección y proporcionar un tratamiento antimicrobiano efectivo, es importante identificar los microorganismos implicados en la patogénesis de esta infección [59]. Las condiciones ambientales en los canales radiculares son diferentes a las de la cavidad oral en lo que se refiere a disponibilidad y tipo de nutrientes, presión de oxígeno y pH; por lo que los microorganismos que accedan deberán de ser capaces de adaptarse a este ambiente. En un canal radicular infectado se pueden encontrar más de 12 especies microbianas, tanto Gram Positivas como Gram Negativas, pero especialmente abundan las anaerobias. En un canal radicular infectado los nutrientes son generalmente péptidos y aminoácidos, lo que facilita el crecimiento de especies proteolíticas anaerobias [60]. Generalmente, las especies microbianas aisladas con más frecuencia en infecciones primarias de canales radiculares pertenecen a los géneros *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* [59, 61]. Tras un primer tratamiento endodóntico pueden originarse infecciones persistentes de los canales radiculares, debido a que algunos microorganismos quedaron en la parte apical de los canales radiculares, zonas de difícil acceso para la instrumentación o soluciones irrigantes empleadas en el tratamiento. Otra causa puede ser que estos microorganismos hayan accedido al sistema radicular durante o una vez finalizado el tratamiento [62]. Si estos microorganismos son capaces de sobrevivir bajo las condiciones limitantes de nutrientes, oxígeno y pH elevados, serán la causa de infecciones persistentes post-tratamiento. Esta nueva microflora es

diferente a la anterior al tratamiento endodóntico. Las especies de microorganismos Gram positivos aerotolerantes son aisladas con más frecuencia tras una reinfección de los canales radiculares, se ha visto que poseen una incrementada resistencia a los agentes antimicrobianos utilizados durante el tratamiento endodóntico [58, 59]. Diversos estudios microbiológicos demuestran que el género *Enterococcus* es aislado en mayor proporción en infecciones periapicales persistentes tras una obturación de los canales radiculares [63–65]. Concretamente, *Enterococcus faecalis* se aísla en baja proporción de canales radiculares no tratados [66], pero está implicado en un 70% de las infecciones periradiculares tras tratamiento [62]. *E. faecalis* expresa una serie de características, factores de supervivencia y factores de virulencia que le permiten sobrevivir y colonizar los canales radiculares, y además resistir a los tratamientos endodónticos, lo que hace que esté implicado en infecciones persistentes [67].

Factores de virulencia, supervivencia y características de *E. faecalis*:

- Factores de secreción.
- Producción de enzimas líticas.
- Substancias de agregación.
- Cápsula polisacáridica.
- Adherencia a las células del huésped.
- Expresión de proteínas que le permiten competir con otros microorganismos y alterar el sistema de defensa del huésped [62, 68].

- Proteína de unión a colágeno (Ace) que le permite unirse a la dentina [69].
- Resiste a prolongados períodos de falta de nutrientes y es capaz de utilizar el suero como fuente de nutrientes [70].
- Capacidad de sobrevivir a elevadas concentraciones de sal.
- Invade los túbulos dentinarios y es capaz de resistir al efecto de soluciones irrigadoras y medicamentos intraconducto [71, 72].
- Tolerancia a pH elevados, lo que le permite resistir al efecto del hidróxido de calcio, utilizado como medicamento intraconducto.
- En el modo de crecimiento de biofilm presenta una incrementada resistencia al sistema inmune del huésped y al efecto de los antimicrobianos [73].
- Un factor externo a *E. faecalis* pero favorable para su persistencia, es el hecho de que algunos componentes de la dentina alteran el efecto antibacteriano de los medicamentos intraconducto [74].
- Es capaz de permanecer bajo condiciones ambientales adversas, en un estado viable pero no cultivable, manteniendo así su viabilidad y patogenicidad, siendo capaz de reanudar su división cuando las condiciones se vuelven más favorables para el crecimiento [70, 75].

1.2.2. Condiciones para infecciones persistentes

En infecciones primarias de canales radiculares, donde hay un buen aporte de nutrientes, se aíslan mayoritariamente especies microbianas anaerobias. Tras un tratamiento endodóntico y una obturación del canal radicular, las condiciones en el sistema radicular cambian. Aquellos microorganismos que permanecieron en áreas inaccesibles al tratamiento, que han sido capaces de resistir al tratamiento químico-

mecánico y a las condiciones adversas, presentan la capacidad de progresar hacia el interior de los túbulos dentinarios intrarradiculares [76]. Estos microorganismos residuales serán la causa de un fracaso en el tratamiento endodóntico, y estarán implicados en infecciones persistentes de canales radiculares.

Las diversas estrategias que desarrollan los microorganismos para conseguir sobrevivir a las condiciones adversas de los canales radiculares tras tratamiento se resumen a continuación:

- Los microorganismos quedan adheridos a las paredes del canal radicular formando biofilm, proporcionando resistencia a los antimicrobianos [73].
- Los microorganismos que permanecen en zonas inaccesibles al tratamiento convencional, escapan de la acción del tratamiento mecánico y de los irrigantes [71, 77].
- Ciertos componentes de la dentina y fluidos de los tejidos pueden inactivar la acción de los antimicrobianos [78].
- Algunos individuos pueden expresar resistencia a los antimicrobianos o a la medicación intraconducto [79].
- Adaptación de los microorganismos residuales a las nuevas condiciones ambientales del sistema radicular tras el tratamiento endodóntico, como la baja disponibilidad de nutrientes. Los microorganismos pueden obtener los nutrientes de la saliva [80], del exudado inflamatorio, o de los restos de tejido necrótico. O bien pueden adaptarse al nuevo ambiente mediante la regulación de la expresión de genes que les permite obtener energía a partir de otras fuentes y nutrientes [81].

Es fundamental la eliminación, no solo de los microorganismos implicados en la infección primaria y que puedan quedar de manera residual tras tratamiento, si no también evitar la entrada de microorganismos durante el proceso del tratamiento, para así mejorar la calidad y conseguir el principal objetivo del tratamiento endodóntico [82].

1.2.3. Tratamiento endodóntico

El tratamiento endodóntico consiste en un procedimiento de reparación químico-mecánica del canal radicular, seguido del uso de medicación intraconducto, para conseguir su principal objetivo: la limpieza completa del contenido de los conductos infectados y su desinfección [58]. Posteriormente, el paso final es la obturación correcta y hermética del conducto radicular.

Mediante instrumentación y el uso de irrigantes se puede acceder al canal radicular principal, donde habitan el mayor número de los microorganismos implicados en la infección. No obstante, debido a la compleja anatomía del sistema de conductos radiculares, el tratamiento mediante instrumentación no puede ser muy profundo, dejando zonas sin tratar, restos de dentina cortada y residuos de tejido pulpar que forman una capa residual en las paredes del canal radicular denominada "*smear layer*" [83], que puede penetrar en el interior de los túbulos dentinarios. Además, en el caso de dientes infectados, esta capa residual contiene bacterias, favoreciendo su crecimiento en el interior de los túbulos.

Desde su primera aplicación en el año 1957 [84], también se utilizan técnicas de ultrasonidos para la preparación de los conductos radiculares. El fenómeno de la cavitación por ellos generado contribuye a la limpieza de los canales [85]. No obstante, tanto la limpieza de las paredes de la dentina como la acción antibacteriana no son suficientes con estas técnicas [86, 87].

Ante la poca eficacia antibacteriana de la instrumentación, es necesario suplementar la preparación mecánica con una desinfección química de los canales radiculares. En la preparación del conducto radicular, el uso de irrigantes ayuda a remover los escombros y la capa residual, limpiar zonas inaccesibles para la instrumentación, eliminar microorganismos y neutralizar sus componentes antigénicos, y lubricar los instrumentos para facilitar su acción [60]. Con todo esto, el uso de irrigantes favorece la obturación del sistema de conductos radiculares y también mejora el sellado apical, debido a que se da una mayor adhesión a las paredes de la dentina [88]. Han sido propuestos varios irrigantes, pero el más utilizado es el hipoclorito de sodio (NaOCl), a concentraciones variables ente 0,5 y 2,5%. Resulta efectivo en disolver restos de tejido pulpar y en eliminar microorganismos junto con sus componentes antigénicos. No obstante, varios estudios han revelado que su efecto antibacteriano no es suficiente para eliminar completamente la presencia de microorganismos [89, 90]. Además, durante la instrumentación, se debe irrigar continuamente debido a que las soluciones de hipoclorito de sodio pierden efectividad con el tiempo [91]. Como alternativa, se ha propuesto el uso de gluconato de clorhexidina al 2% como solución irrigadora,

pero algunos estudios clínicos han demostrado que su efecto antibacteriano no es superior al del NaOCl al 2,5% [92, 93].

En infecciones de conductos radiculares que hayan progresado con una periodontitis apical, el uso únicamente de instrumentación manual o mecánica junto con soluciones irrigadoras resulta tener poca eficacia antibacteriana. En estos casos, para conseguir eliminar los microorganismos residuales de canales radiculares infectados es necesario suplementar la preparación de los conductos radiculares con sustancias químicas colocadas como medicación en el interior de los conductos. Como medicación intraconducto se pueden emplear soluciones de hipoclorito sódico del 1 al 5%, antibióticos o clorhexidina en gel al 2%. Varios estudios han demostrado que la administración intraconducto de pastas de hidróxido de calcio tras la limpieza químico-mecánica de los canales radiculares incrementa la eficacia antibacteriana del tratamiento endodóntico [94, 95]. En 1920 se introdujo el uso de pastas de hidróxido de calcio en el tratamiento endodóntico, presentan un pH alrededor del 12,5 y son escasamente solubles en agua, por lo que se solubilizan de forma lenta en los tejidos del organismo. Su efecto antibacteriano se debe principalmente al aumentar el pH por la disociación en iones de calcio e iones hidroxilo, lo cual impide el crecimiento antibacteriano. A esta característica, se le puede sumar su acción de favorecer los procesos de reparación hística [91]. No obstante, el hidróxido de calcio difunde muy lentamente a través de la dentina, se crea un gradiente de concentración a lo largo de la pared de la raíz debido a la capacidad amortiguadora de la dentina, limitando el efecto antibacteriano del

hidróxido de calcio [96, 97]. A pesar de los buenos resultados que se han obtenido con el uso de hidróxido de calcio como medicación intraconducto, ciertos microorganismos pueden expresar resistencia a esta medicación, como es el caso de *E. faecalis* (explicado anteriormente).

Una vez realizado el tratamiento químico-mecánico y administrado la medicación intraconducto, la última fase del tratamiento endodóntico es la obturación de los conductos radiculares. Los microorganismos que hayan quedado en la región apical del conducto radicular o en conductos laterales podrían favorecer la aparición de infecciones persistentes. Por lo tanto, antes de obturar se debería eliminar el máximo número de microorganismos [58], componentes antigénicos y restos pulpares de los conductos radiculares, para aislarlos por completo, manteniendo los resultados de su preparación y favoreciendo el éxito del tratamiento endodóntico.

1.2.4. Terapias alternativas al tratamiento endodóntico convencional

1.2.4.1. Terapia con luz láser

La luz láser (*light amplification by stimulated emission of radiation*, amplificación de luz por emisión estimulada de radiación) proviene de una emisión estimulada que genera una forma de luz de una sola longitud de onda (monocromática) y en una misma dirección (coherencia). Estas características permiten que la luz láser se pueda concentrar y dirigir a un punto concreto, por lo que desde que se inventaron en 1960, sus aplicaciones han sido bastante numerosas. En

tejidos biológicos, la luz láser dirigida puede ser reflejada, dispersada, transmitida o absorbida por el tejido. La absorción de la luz láser por los tejidos es debida a la presencia de pigmentos, proteínas, moléculas libres de agua y otras macromoléculas. El coeficiente de absorción depende de la longitud de onda de la luz láser emitida [98]. Los primeros en aplicar la luz láser en endodoncia fueron Weichman & Johnson en 1971 [99], mediante un láser infrarrojo de alta potencia trataron de sellar el orificio del conducto radicular en el ápice de un diente.

El principal objetivo del tratamiento endodóntico es conseguir la eliminación de microorganismos de los conductos radiculares. El tratamiento endodóntico convencional incluye el uso de técnicas de instrumentación y soluciones irrigadoras para la preparación del conducto radicular, la aplicación de medicación intraconducto para acabar de eliminar los microorganismos residuales y limpiar las paredes de los conductos radiculares, y finalmente la obturación para aislar por completo el conducto radicular. A pesar de que diversos estudios han demostrado la efectividad del tratamiento endodóntico convencional, no es suficiente para erradicar la presencia de microorganismos residuales. La anatomía del sistema de conductos radiculares es muy compleja, lo que dificulta el acceso de las soluciones irrigadoras y la medicación intraconducto obstaculizando su efectividad, y la penetración de estas sustancias a través de la dentina es escasa. Estas áreas inaccesibles constituyen reservorios importantes de ciertos microorganismos como *E. faecalis*, que es capaz de formar estructuras complejas denominadas biofilm complicando su

eliminación, por lo que podrían aparecer reinfecciones de los conductos radiculares tras un tratamiento [100, 101].

Debido a las características descritas anteriormente, la luz láser puede representar una alternativa para incrementar la limpieza y eliminación de la capa residual de las paredes, y mejorar la desinfección de las zonas profundas y de difícil acceso del sistema de conductos radiculares [102]. Desde su primera aplicación en 1971, varios tipos de luz láser han sido utilizados en el tratamiento endodóntico. A continuación, se describen según sus características y aplicaciones en endodoncia:

- Láser de Diodo y Láser de Nd:YAG. Los láseres de diodo más utilizados son los comprendidos entre las longitudes de onda de 810 nm y 980 nm, mientras que el láser de Neodimio:YAG emite una luz láser con una longitud de onda de 1064 nm. Ambos láseres se transmiten a través de una fibra óptica, por lo que se pueden introducir mejor en el interior de los conductos radiculares [103]. Producen un elevado efecto térmico que puede penetrar en profundidad a través de los tejidos dentales y acceder a las partes inaccesibles de la red de túbulos dentinarios [104, 105].
- Láser de Er:YAG y láser de Er,Cr:YSGG. Los tipos de láser de Erbium, vienen equipados con puntas finas y flexibles para facilitar su aplicación. El láser de Er:YAG tiene una longitud de onda de 2940 nm y el láser de Er,Cr:YSGG de 2780 nm. Ambos láseres son absorbidos superficialmente por aquellos tejidos que

contienen grandes cantidades de agua [103]. El efecto térmico vaporiza el agua, provocando una expansión del vapor de agua que genera un efecto fotomecánico, de este modo se consigue una ablación superficial que ayuda a descontaminar la superficie de la dentina en áreas intertubulares ricas en agua [106-108].

Este efecto fototérmico y fotomecánico de todos los tipos de láseres, junto con el uso de soluciones irrigadoras introducidas en el interior de los conductos radiculares, ayuda a la limpieza de la superficie de la dentina eliminando la capa residual, restos de pulpa y de microorganismos [109, 110].

1.2.4.2. Terapia Fotodinámica

En 1900, Oscar Raab fue el primero en proponer la terapia fotodinámica al estudiar el efecto letal del clorhidrato de acridina y la luz visible en *Paramecium caudatum* [111]. La terapia fotodinámica (PDT) (figura 1.7) se basa en el uso de moléculas (fotosensibilizadores) que pueden ser absorbidas por los microorganismos o bien se pueden unir a sus superficies, y al ser activadas en presencia de oxígeno con una luz de una determinada longitud de onda generan moléculas de oxígeno singlete y radicales libres que son citotóxicos para los microorganismos [112]. Los láseres de alta potencia son capaces de reducir el número de microorganismos implicados en infecciones endodónticas mediante un efecto térmico [113], que puede afectar también a los tejidos.

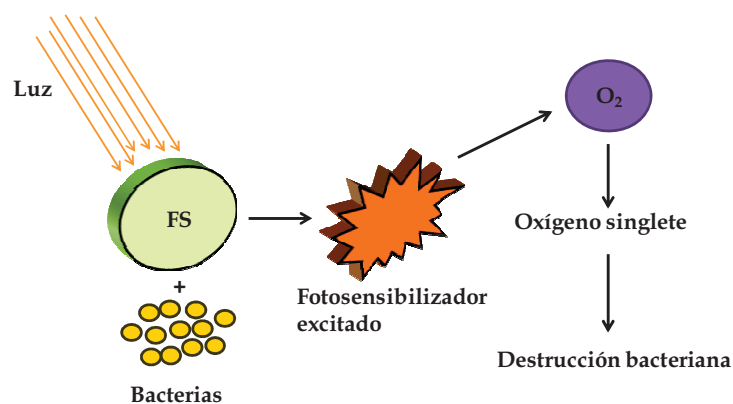


Figura 1.7 Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica.

La terapia fotodinámica combina láseres de baja potencia con fotosensibilizadores, por lo que el efecto letal no es causado por un incremento de la temperatura, sino por la generación de compuestos citotóxicos [114].

Las principales características que hacen de la terapia fotodinámica una buena alternativa como terapia antimicrobiana se resumen a continuación [115]:

- Amplio espectro de acción, debido a que los fotosensibilizadores pueden ser captados por bacterias, levaduras, hongos y parásitos.
- Se puede limitar su efecto solo a los microorganismos, eliminando un gran número de ellos y evitando posibles daños en los tejidos del huésped.
- Es poco probable que aparezcan microorganismos resistentes tras varios tratamientos.
- Permite el uso de fuentes de luz económicas para activar las moléculas fotosensibilizadoras.

Para que una terapia fotodinámica sea efectiva contra los microorganismos, las propiedades de un fotosensibilizador deberían ser las siguientes [115]:

- Poder mantener durante largo tiempo el estado de triplete para obtener grandes cantidades de oxígeno singlete y de radicales libres.
- Elevada afinidad de unión a distintos microorganismos junto con un amplio espectro de acción.
- Baja afinidad por las células de los tejidos del huésped, con el fin de evitar efectos no deseados.
- Mecanismo de inactivación celular para minimizar la selección de microorganismos resistentes y evitar el desarrollo de procesos mutagénicos.
- Baja toxicidad química.

Los fotosensibilizadores cargados positivamente como las porfirinas, ftalocianinas y fenotiaccinas, resultan ser más efectivos en la fotoinactivación tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas [116, 117]. En general, las bacterias Gram positivas suelen ser más susceptibles a la fotoinactivación que las Gram negativas debido a la elevada porosidad de la pared bacteriana, que permite el paso de macromoléculas de gran tamaño molecular (30000 a 60000 Da) [118]. Por lo que los fotosensibilizadores comúnmente utilizados de peso molecular entre 1500 y 1800 Da pueden acceder sin problema hacia la membrana plasmática. En el caso de las bacterias Gram negativas, la membrana externa supone una barrera para la difusión de los fotosensibilizadores, puesto que tan solo permite el paso de

moléculas de tamaño molecular entre 600 y 700 Da a través de las porinas [119]. La fotoinactivación con fotosensibilizadores neutros o cargados negativamente no es tan efectiva en bacterias Gram negativas, para ello es necesario incrementar artificialmente la permeabilidad con agentes que desorganizan la membrana externa y desestructuran la pared bacteriana, como son cloruro de calcio, EDTA y el polipéptido catiónico polimixina B [120, 121]. En el caso de los fotosensibilizadores catiónicos, la carga positiva promueve su unión a la membrana externa de las bacterias Gram negativas induciendo un daño localizado y favoreciendo la penetración del fotosensibilizador [116].

Los fotosensibilizadores más utilizados en terapia fotodinámica para la eliminación de microorganismos implicados en infecciones endodónticas son el azul de toluidina O y el azul de metileno. Varios estudios realizados *in vitro* han demostrado su eficacia con una reducción de hasta un 80% en la viabilidad de *E. faecalis* en conductos radiculares infectados [122-126]. Estos fotosensibilizadores se pueden dirigir tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, puesto que su carga positiva junto con el bajo peso molecular permiten su difusión a través de las porinas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas [127].

Como resultado del importante efecto antimicrobiano de la terapia fotodinámica, ha sido utilizada como una ayuda al tratamiento endodóntico convencional [128, 129]. De este modo, se puede llegar a conseguir el principal objetivo del tratamiento endodóntico, la

completa eliminación de los microorganismos implicados en las infecciones de conductos radiculares.

1.3. Biofilm de *Candida albicans*

Muchos microorganismos en su hábitat natural, se encuentran predominantemente como biofilm y no como células en libre flotación o células planctónicas. El biofilm es una estructura tridimensional compleja fuertemente adherida a una superficie, en la que los microorganismos están integrados en una matriz extracelular de polímeros. A nivel clínico, el primer biofilm reconocido fue la placa dental en la superficie de los dientes, pero actualmente, una significativa proporción de las infecciones microbianas humanas están asociadas a biofilm [130, 131]. Los microorganismos que crecen formando biofilm, presentan un conjunto de ventajas y unas características fenotípicas diferentes a los que crecen en forma planctónica, como protección a condiciones adversas del ambiente, una incrementada resistencia a agentes antimicrobianos y protección frente al sistema inmune del huésped [106, 132]. Las biopelículas pueden estar adheridas a la superficie de tejidos como es el caso de la fibrosis quística, en la que biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* se adhieren a la superficie de la mucosa pulmonar, provocando graves complicaciones en esta enfermedad [133]. Pero también se pueden adherir a otro tipo de superficies como catéteres, prótesis o implantes, afectando a la función de estos elementos [134]. Tras la adhesión y una vez formadas las biopelículas, de las capas más superficiales se desprenden células microbianas que a través del torrente sanguíneo

pueden acceder a otras superficies donde adherirse; este importante proceso contribuye a la dispersión de los microorganismos y a la transmisión de las enfermedades [135]. Las infecciones microbianas relacionadas con biofilm pueden llegar a ser persistentes y crónicas, su compleja estructura que aísla a los microorganismos integrados en ella, impide la acción de las defensas inmunes del huésped y reduce la eficacia de las terapias antimicrobianas, por lo que su erradicación llega a resultar altamente complicada. Estas biopelículas pueden estar formadas por una única especie microbiana o por varias especies tanto bacterianas como fúngicas [136-138]. El interés científico en estudiar y obtener información sobre la estructura, composición y propiedades de las biopelículas fúngicas ha ido incrementando debido a la relevancia clínica de las infecciones fúngicas asociadas a biofilm. Concretamente, *Candida albicans* es la especie fúngica más comúnmente relacionada con la formación de biofilm [139].

1.3.1. *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo pleomórfico que puede crecer en forma de levadura o en forma filamentosa. Las células levaduriformes son unicelulares y pueden ser cultivadas por debajo de 37°C. Las formas filamentosas pueden ser pseudohifas o verdaderas hifas. La morfología de pseudohifa se asemeja a la levaduriforme, solo que las células son más alargadas, al dividirse permanecen unidas unas con otras con constricciones en el septo, normalmente crecen formando un patrón de ramificación. Las formas filamentosas en hifas aparecen cuando se cultiva *C. albicans* a 37°C, pH 7 y en suero o medios que contengan factores de crecimiento, puesto que estas condiciones

fisiológicas favorecen la expresión de las hifas [140]. *C. albicans* es un comensal que se puede encontrar en la superficie de las mucosas de la cavidad oral, tracto gastrointestinal y urogenital, pero tiene la habilidad de causar infecciones oportunistas en estas superficies. Ciertas condiciones como una situación de estrés, un sistema inmune comprometido, o tratamientos prolongados con antimicrobianos que pueden eliminar parte de la microbiota, propician la colonización e invasión de estos tejidos por este microorganismo. Las infecciones producidas por *C. albicans* se denominan “candidiasis”, y en su mayoría están asociadas a la formación de biofilm sobre superficies biológicas, biomateriales como prótesis, implantes o en dispositivos médicos de uso permanente como catéteres. En los últimos años, un aumento de candidiasis ha estado relacionado con un aumento en el uso de una amplia gama de dispositivos médicos implantados [139]. Estos factores han contribuido a la emergencia de *C. albicans* como un importante patógeno nosocomial, la candidiasis se encuentra entre las infecciones nosocomiales más comunes en hospitales de USA [141].

1.3.2. Desarrollo y características del biofilm de *C. albicans*

1.3.2.1. Formación y desarrollo del biofilm

La formación y desarrollo del biofilm de *C. albicans* es un proceso que incluye la adhesión a una superficie, colonización, producción de material polisacárido, maduración del biofilm y finalmente la dispersión a partir de células levaduriformes que se liberan o disgregan de las capas superficiales del biofilm (figura 1.8) [142, 143].

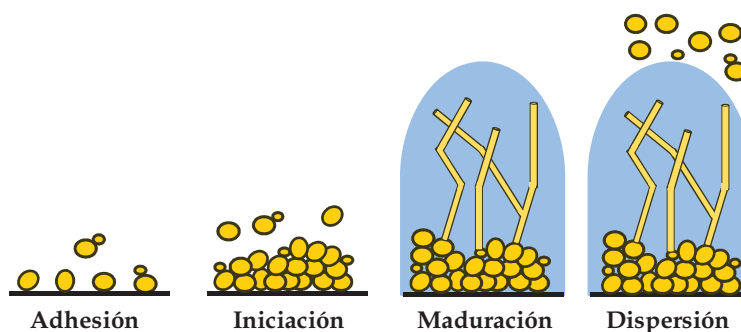


Figura 1.8 Representación esquemática de las fases en el desarrollo del biofilm de *C. albicans*: adhesión, colonización, maduración y dispersión.

La adhesión es un proceso vital para iniciar la colonización de una superficie, tanto biológica como inerte, y para llegar a establecer una infección. El anclaje inicial está mediado por factores no específicos como la hidrofobicidad de una superficie o fuerzas electroestáticas, y por factores específicos como la expresión de adhesinas que reconocen proteínas de la matriz extracelular de las células del huésped, proteínas presentes en el suero y en la saliva [144].

Una vez producida la adhesión se estimula la formación del biofilm. En la fase temprana (0-11h) de su desarrollo, las células levaduriformes se empiezan a dividir formando pequeñas colonias a lo largo de la superficie. Durante la fase intermedia (12-30 h) se produce la formación de pseudohifas e hifas que conforman una estructura que proporciona estabilidad al biofilm, nuevos puntos de adhesión y protección para las células levaduriformes [145]. En esta fase intermedia también se empieza a formar la matriz polimérica extracelular, cuya producción y cantidad aumenta durante la fase de maduración (31-72 h). La matriz extracelular está compuesta hasta un 97% por agua, y el resto es material polimérico que consiste en

proteínas, quitinas, DNA extracelular y carbohidratos β -1,3 glucano [146]. La matriz extracelular polimérica recubre el biofilm y puede resultar impenetrable para los antifúngicos y factores del sistema inmune del huésped, además, confiere protección frente a tratamientos físicos que puedan alterar la integridad del biofilm [147].

1.3.2.2. Modelos de biofilm de *C. albicans*

La estructura y composición de las biopelículas formadas por *C. albicans*, así como también sus propiedades, se han podido estudiar a partir de experimentos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, y utilizando varias técnicas de microscopía para visualizar su estructura. Inicialmente, Hawser & Douglas [148] describieron un modelo de biofilm *in vitro* adherido a la superficie de pequeños discos de catéteres y examinaron su arquitectura mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal. Posteriormente, han sido utilizados una gran variedad de modelos de biofilm *in vitro* bajo condiciones de crecimiento estáticas o en agitación, y empleando diversos sustratos como pueden ser diferentes tipos de plástico, cubre-objetos de vidrio, filtros cilíndricos de celulosa, discos y dentaduras de acrílico, placas de microtitulación o frascos de cultivo celular [149-154].

Los modelos de biofilm *in vitro* permiten incorporar numerosas variables experimentales y determinar cómo puede afectar a la adhesión, desarrollo, estructura y susceptibilidad del biofilm. Así mismo se ha observado que bajo condiciones de agitación se incrementa considerablemente la producción de matriz polimérica

extracelular [155]. Otros factores como el tipo de sustratos utilizados en los modelos de biofilm, la rugosidad de la superficie de estos sustratos, la hidrofobicidad de los materiales, o la presencia de una película de proteínas del suero o de la saliva humana en las superficies de los sustratos, se ha descrito que tienen un efecto positivo sobre la adhesión inicial, formación y estructura del biofilm [156-160]. A partir de los modelos de biofilm *in vitro* se ha podido investigar las propiedades del desarrollo de las biopelículas, estudiar la actividad metabólica de las células que integran el biofilm, evaluar la susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos o cuantificar la formación de biofilm [143, 147, 161-163].

No obstante, a pesar de las numerosas investigaciones realizadas con modelos de biofilm *in vitro*, es difícil duplicar con exactitud la multitud de variables ambientales experimentadas por el biofilm en el huésped [164]. En los modelos de biofilm *in vivo*, en los que se estudia el biofilm formado en catéteres implantados en el sistema venoso central de animales, es posible tener en cuenta la relación entre el biofilm y el sistema inmune del huésped, así como también las condiciones de flujo del torrente sanguíneo o la aportación de nutrientes; con el objetivo de llegar a una mejor comprensión del proceso de infección asociado a la formación de biofilm en dispositivos clínicos [165-168].

Las técnicas de microscopía han sido utilizadas extensamente por numerosos grupos para estudiar la estructura y desarrollo del biofilm de *C. albicans* [153, 154]. La microscopía electrónica de barrido

(*Scanning Electron Microscopy*, SEM) proporciona imágenes tridimensionales de una elevada resolución, mediante esta técnica se ha podido observar que un biofilm maduro de *C. albicans* está compuesto tanto por células levaduriformes como formas filamentosas, pseudohifas e hifas [147]. No obstante, a pesar de la elevada resolución de la técnica SEM, los biofilms deben someterse a tratamientos de fijación que alteran notablemente su morfología y estructura. La microscopía confocal láser de barrido (CLSM) permite la visualización directa de biofilms vivos, pudiendo observar con más detalle la matriz extracelular y cuantificar la producción de biofilm [169]. Mediante CLSM se ha caracterizado el biofilm de *C. albicans* como una compleja estructura tridimensional que puede llegar a tener un espesor de 50 a 350 μm [170], formada por microcolónias integradas en una matriz extracelular, denominadas torres o agrupaciones en forma de seta, conectadas entre sí mediante canales de agua que permiten la circulación de nutrientes dentro del biofilm [133].

1.3.2.3. Características del crecimiento en biofilm de *C. albicans*

En las diferentes etapas de formación y desarrollo del biofilm de *C. albicans* tienen lugar varios procesos que juegan un papel importante en la interacción célula-sustrato o adherencia entre células, en el desarrollo de las hifas, *quorum sensing*, en la producción de matriz extracelular y en la resistencia a los antimicrobianos.

- Interacción célula-sustrato y célula-célula. La interacción al sustrato y la adherencia entre las propias células de *C. albicans* son

esenciales para la formación, desarrollo y madurez del biofilm, así como también para mantener una relación comensal con el huésped o para establecer una infección mediante la colonización de las superficies de mucosas, biomateriales o implantes [140]. En el proceso de adhesión tanto a superficies biológicas como inertes, están implicados factores importantes como la morfogénesis de las hifas, la hidrofobicidad de la superficie celular, y la presencia de adhesinas de superficie y receptores [171]. Las adhesinas codificadas por la familia de genes *ALS* se ha estudiado que pueden facilitar la coagregación entre las células levaduriformes y, concretamente las proteínas Als1 y Als3 juegan un papel importante en la formación del biofilm [172-174].

- Morfogénesis de las hifas. Como se ha comentado anteriormente, *C. albicans* es capaz de crecer tanto en forma de células levaduriformes como en forma filamentosa. Ha sido demostrado que las hifas son elementos esenciales en la estructura del biofilm en *C. albicans*, no tanto para su formación, puesto que se han descrito biofilms formados únicamente por células levaduriformes, si no para mantener el desarrollo y la arquitectura organizada de los biofilms maduros altamente estructurados [144, 149]. La capacidad de *C. albicans* de cambiar entre la forma levaduriforme y la forma filamentosa se considera necesaria para su virulencia. Las formas levaduriformes podrían facilitar la diseminación a través del sistema sanguíneo, mientras que las formas filamentosas podrían ser importantes en la colonización

promoviendo la penetración en tejidos durante las primeras fases de la infección [175].

- *Quorum sensing*. Los microorganismos que componen un biofilm interactúan entre ellos mediante la secreción de moléculas de señalización, a esta vía de señalización célula-célula se le denomina *quorum sensing*. El *quorum sensing* es fundamental durante la formación del biofilm, puesto que una comunicación entre las células permite controlar la competición por los nutrientes y prevenir un sobre crecimiento del biofilm [144, 176]. El fenómeno de *quorum sensing* fue descrito en eucariotas por primera vez en *C. albicans*, Hornby *et al.* [177] fueron los primeros en describir que este microorganismo produce farnesol como molécula de señalización y que inhibe la filamentación. Cao *et al.* [178], mediante análisis de microarrays de cDNA, concluyeron que el farnesol presenta un amplio efecto en mecanismos como el desarrollo de hifas, hidrofobicidad de la superficie celular y en la resistencia a antimicrobianos [144]. Una segunda molécula implicada en *quorum sensing* aislada de *C. albicans* es tyrosol, que promueve la formación del tubo germinativo [179]. El tyrosol se expresa tanto en células planctónicas como en biofilm, produciéndose en mayores cantidades en biofilm, concretamente en las primeras fases del desarrollo [180].
- Resistencia a antimicrobianos. Los microorganismos que crecen formando biofilm, presentan una mayor resistencia a los antimicrobianos que los que crecen en forma planctónica. No se

conocen del todo los mecanismos de resistencia del biofilm de *C. albicans* pero se sugiere que pueden estar implicados varios factores como la compleja estructura y la elevada densidad de células que forman el biofilm, la presencia de matriz extracelular (limita la penetración de antimicrobianos), el estado fisiológico de las células, una tasa de crecimiento lenta, la limitación de nutrientes o la expresión de genes de resistencia [181-186].

1.3.3. *C. albicans* y mutantes CFEM

Se han sugerido varios factores en la virulencia de *C. albicans*, algunos descritos anteriormente, como la presencia de adhesinas y receptores para ligandos de células del huésped, producción de enzimas hidrolíticos extracelulares, formación de hifas y la habilidad de crecer formando biofilms [147, 175, 187, 188]. Todos estos factores están interrelacionados entre ellos puesto que la adhesión celular depende de la hidrofobicidad de la superficie celular, de la presencia de adhesinas, receptores y componentes de la superficie celular de *C. albicans* implicados en la interacción entre las células fúngicas y las células del huésped. A su vez, la adhesión contribuye a la morfogénesis de las hifas, elementos importantes para mantener la integridad estructural y la arquitectura típica de los biofilms maduros. En este contexto, se ha revelado la existencia en *C. albicans* de una familia de proteínas unidas a la superficie que contienen un dominio de 8 residuos de cisteína denominado *Common in several Fungal Extracellular Membrane* (CFEM), que podrían actuar como receptores de superficie celular, como transductores de señales, o como moléculas de adhesión en las interacciones huésped-patógeno [189].

Varios investigadores han tratado de caracterizar molecular y funcionalmente los genes que codifican la síntesis de proteínas pertenecientes a la familia que contiene el dominio CFEM, particularmente *PGA10*, *RBT5* y *WAP1*, mediante la construcción de mutantes sencillos, dobles y triples para dichos genes [190-192]. Pérez *et al.* [190] sugirieron que las proteínas codificadas por estos genes podrían estar implicadas en la formación, desarrollo y/o en el mantenimiento de la estructura del biofilm en *C. albicans*, tras observar que el biofilm formado por estos mutantes era frágil y aparecía en forma de pequeñas películas débilmente adheridas al sustrato.

La microscopía de fuerza atómica es una herramienta de gran utilidad para observar la morfología y la arquitectura del biofilm formado por *C. albicans*, y los mutantes mencionados anteriormente, a nivel micro y nano molecular, permitiendo estudiar las diferencias en la estructura de cada biofilm, evaluar si la naturaleza de un sustrato influye en la formación de biopelículas, y analizar tanto de forma cualitativa como de forma cuantitativa la estructura de la superficie celular de *C. albicans*.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido la puesta a punto de la microscopia de fuerza atómica en el contexto de la investigación que se desarrolla en el grupo de Microbiología de Bellvitge en cooperación con el departamento de odontoestomatología. Los objetivos parciales podrían enumerarse como sigue:

1. Caracterizar diferencias morfológicas y de rugosidad entre las superficies celulares de *C. albicans* y de sus mutantes CFEM mediante microscopía de fuerza atómica.
2. Estudiar la formación y la estructura de biofilms de *C. albicans* y de sus mutantes CFEM adheridos a diferentes tipos de sustratos, y posteriormente visualizar los biofilms formados mediante la utilización del microscopio de fuerza atómica.
3. Comparar las eficiencias del láser Er,Cr:YSGG y del láser Diodo en la inactivación de microorganismos patógenos presuntamente agentes etiológicos de las infecciones que conducen al fallo de la endodoncia.
4. Explorar la acción de la terapia fotodinámica en biofilms de microorganismos mediante la utilización combinada de agentes fotosensibilizadores con luz LED y un láser Diodo.
5. Visualización por microscopía de fuerza atómica de las superficies microbianas después del tratamiento y comparación con las de los microorganismos no tratados.

Objetivos

6. Realizar experimentos de espectroscopía de fuerza, utilizando nanopuntas funcionalizadas para medir las fuerzas de adhesión de los microorganismos a diferentes tipos de sustratos, y la interacción célula-célula en biofilms microbianos

Obviamente la elección de estos objetivos no es fortuita sino que está en relación con el resto de la investigación del grupo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas microbianas

Las características de las especies fúngicas y bacterianas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 3.1.

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
CAI4-URA3	Control	Pérez <i>et al.</i> 2006 [190]
CAN1	Mutación gen <i>PGA10</i>	Pérez <i>et al.</i> 2006 [190]
KC100	Mutación genes <i>PGA10</i> y <i>RBT5</i>	Weissman & Kortnitzer 2004 [192]
KC171	Mutación genes <i>PGA10</i> , <i>RBT5</i> y <i>WAP1</i>	Weissman & Kortnitzer 2004 [192]
<i>E. faecalis</i>	Control	ATCC 29212

Tabla 3.1 Cepas levaduriformes y bacterianas

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Caldo YPD

YPD es un medio enriquecido que contiene todas las sales minerales, vitaminas y carbohidratos necesarios para el crecimiento y mantenimiento de levaduras.

Composición en g/l:

Extracto de levadura	10.0
Peptona	20.0
Glucosa	20.0

Preparación: Todos los componentes se disolvieron en 1 litro de agua destilada y se ajustó el pH a 6.5 ± 0.2 a 25°C. Posteriormente, se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.

3.2.2. Agar YNB

YNB es un medio mínimo utilizado para el crecimiento de las cepas transformantes de *C. albicans*.

Composición en g/l:

Base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos ni sulfato de amonio	1.7
Sulfato de amonio	5.0
Glucosa	20.0
Agar	15.0

La preparación del medio se realizó de la siguiente manera:

- Se disolvieron 1.7 g de la base de nitrógeno sin aminoácidos ni sulfato de amonio en 100 ml de agua destilada y se calentó hasta su completa disolución. La esterilización se realizó por filtración (0.22 μm) y se conservó a 2°C hasta la preparación del medio final.
- El resto de componentes se disolvieron en 900 ml de agua destilada, y se llevaron a ebullición. Seguidamente, se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.
- Posteriormente, se dejó enfriar a 45-50°C y se añadió asepticamente los 100 ml de la base de nitrógeno sin aminoácidos ni sulfato de amonio, preparada previamente.
- Finalmente, el medio fue distribuido en placas de Petri estériles.

3.2.3. Caldo de triptona y soja (TSB)

Medio de cultivo altamente nutritivo para el desarrollo de bacterias tanto aerobias, como anaerobias y hongos. Debido a la inclusión tanto de la triptona como de la peptona de soja, el medio favorece un buen crecimiento de muchos microorganismos exigentes, sin la necesidad de añadir ningún otro componente (por ejemplo suero). Casa comercial: Scharlab.

Composición en g/l:

Triptona	17.0
Peptona de Soja	3.0
Cloruro de Sodio	5.0
Fosfato di-potásico	2.5
Glucosa	2.5

Preparación: Se disolvieron 30 g en 1 litro de agua destilada y se ajustó el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C. Posteriormente, se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.

3.2.4. Agar de triptona y soja (TSA)

Medio sólido equivalente al TSB pero carente de glucosa y fosfato, utilizado para el crecimiento en placa de los microorganismos y para su conservación a corto plazo. Casa comercial: Scharlab.

Composición en g/l:

Triptona	15.0
Peptona de Soja	5.0

Material y Métodos

Cloruro de Sodio	5.0
Agar	15.0

Preparación: Se disolvieron 40 g en 1 litro de agua destilada y se llevó a ebullición. Seguidamente, se ajustó el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C y se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121°C . Posteriormente, el medio de cultivo fue distribuido en placas de Petri estériles.

3.2.5. Medio RPMI-1640 con L-Glutamina sin bicarbonato sódico, tamponado con HEPES 25 mM

Medio rico que contiene los factores necesarios para el crecimiento de un gran número de células humanas. En este trabajo, el medio RPMI-1640 fue utilizado para la formación de biofilm de *C. albicans*.

La preparación de este medio se realizó de la siguiente manera:

- Se disolvieron 16.4 g en 800 ml de agua destilada.
- Posteriormente, se ajustó el pH a 7.2 ± 0.2 a 25°C con hidróxido de sodio 1 N y se acabó de enrasar a 1 litro de volumen final.
- La esterilización del medio se realizó por filtración ($0.22 \mu\text{m}$).
- Finalmente, fueron distribuidos 100 ml en frascos y se conservaron a 2°C en la oscuridad.

3.2.6. Medio de conservación

Medio utilizado para la conservación a largo plazo mediante congelación de las cepas fúngicas y bacterianas estudiadas. Su

composición es YPD para las cepas fúngicas o TSB para las cepas bacterianas, y glicerol al 20% (v/v).

Para conservar los microorganismos, se siguió el siguiente procedimiento:

- Se partió de 5 ml de un cultivo en TSB incubado durante 18 horas a 37°C.
- A continuación, se centrifugó 1 ml en tubos *Eppendorfs* a 8.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- El sedimento se resuspendió en 1 ml de medio de conservación.
- Se guardaron los tubos *Eppendorfs* a -80°C hasta su utilización.

Si se parte de un cultivo en medio sólido, el crecimiento de la placa se resuspende en 1 ml de medio de conservación y se procede de la misma manera.

3.3. Soluciones utilizadas

3.3.1. Tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4

Se utilizó como solución amortiguadora de pH en el lavado y mantenimiento de los microorganismos. Se preparó una solución stock a una concentración diez veces superior a la de utilización.

Composición de la solución de PBS X 10 en g/l:

NaCl	80.0
KCl	2.0
Na ₂ HPO ₄	14.2
KH ₂ PO ₄	2.7

Preparación: Se disolvieron todos los componentes en 1 litro de agua destilada y se ajustó el pH a 7.4 ± 0.2 . Posteriormente, se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.

3.3.2. Tampón de adhesión de saliva

Tampón utilizado para el recubrimiento con saliva de los sustratos utilizados en los experimentos de espectroscopía de fuerza.

Composición para un volumen final de 1 litro:

KCl 0.5 M	100 ml
CaCl ₂ 0.5 M	2 ml
KPi 0.5 M	4 ml
pH 6.8	

Preparación: La saliva liofilizada fue disuelta en el tampón de adhesión a una concentración de 1.5 g/l.

3.3.3. Solución de poli-L-lisina al 0.01 %

Los polímeros de poli-lisina son ampliamente utilizados en cultivos celulares para preparar la superficie de sustratos con el fin de favorecer la fijación celular. Se preparó una solución *stock* de

poli-L-lisina de 1 mg/ml (0.1%) y se conservó a -20°C . Al inicio de cada experimento, se preparó la solución a una concentración final de 0.1 mg/ml (0.01%) diluyendo la concentración *stock* con agua destilada.

3.4. Visualización de muestras biológicas por microscopía de fuerza atómica

Todas las observaciones hechas por microscopía de fuerza atómica de las diferentes muestras y los análisis de rugosidad fueron realizados mediante un microscopio XE-70 SPM (Park Systems, Corea del Sur) situado en la Unidad de Microbiología del Campus de Bellvitge de la Universidad de Barcelona (figura 3.1).

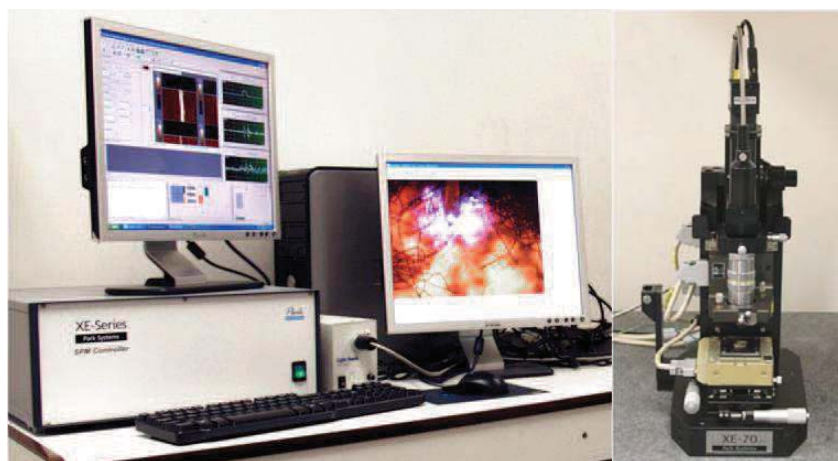


Figura 3.1 Sistema del microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM.

3.4.1. El microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM

El microscopio de fuerza atómica utilizado (XE-70 SPM) consta de diferentes partes, las cuáles se describen a continuación:

- Sistema óptico. La parte óptica del microscopio XE-70 SPM está formada por un objetivo 10X y la cámara CCD. Permite poder enfocar la luz láser sobre el *cantilever*, observar la muestra a unos 500 aumentos, y situar el *cantilever* sobre la zona de la muestra que estemos interesados en visualizar.
- Cabezal. El cabezal del microscopio XE-70 SPM es la parte que interactúa con la muestra y obtiene las medidas. A su vez, está formado por:
 - Escáner piezoeléctrico Z. Controla los movimientos verticales de la nanopunta. En el microscopio XE-70 SPM, el escáner piezoeléctrico Z está completamente separado del escáner piezoeléctrico X-Y, que controla los movimientos de la muestra, lo que permite que la nanopunta pueda reseguir con precisión la topografía de la muestra a un ritmo más rápido.
 - Sonda. La sonda es un componente que se acopla justo debajo del escáner piezoeléctrico Z, y es dónde se coloca el *cantilever*.
 - Sistema de detección óptico de la desviación del *cantilever*. Este sistema está formado por el emisor de la luz láser, un prisma, dos espejos y el PSPD. A través de este sistema, cualquier movimiento de torsión o desviación del *cantilever* producirá cambios en la intensidad de la luz láser reflejada en el PSPD y serán detectados por el microscopio.

- Platina. Es la parte del microscopio donde se coloca la muestra.
- Escáner piezoeléctrico X-Y. Controla los movimientos horizontales de la muestra durante el rastreo del área de la superficie deseada. Los movimientos de los escáneres piezoeléctricos X-Y y Z están combinados para obtener una imagen tridimensional y así poder estudiar con mayor precisión la topografía de la muestra.

Junto con estos componentes descritos que son característicos del microscopio XE-70 SPM, existe el sistema de control, de vital importancia para el funcionamiento del microscopio y común a todos los microscopios de fuerza atómica. El sistema de control está formado por la controladora electrónica y el programa informático. La controladora electrónica se encarga de conectar el microscopio de fuerza atómica con el programa informático, y de procesar las señales que se envían de manera bidireccional entre los dos componentes. Todas las visualizaciones obtenidas mediante el microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM fueron realizadas en aire y en el modo de operación de no-contacto.

3.5. Experimentos de espectroscopía de fuerza

Todas las mediciones de las fuerzas de adhesión realizadas mediante la técnica de AFM de espectroscopía de fuerza fueron obtenidas utilizando el equipo Dimension 3100 SPM (Nanoscope IIIA; Digital Instruments, NY, USA) situado en el *Department of Biomedical Engineering, University Medical Center Groningen* (figura 3.2).



Figura 3.2 Sistema del microscopio de fuerza atómica Dimension 3100 SPM.

3.5.1. El microscopio de fuerza atómica Dimension 3100 SPM

El equipo Dimension 3100 SPM consta de todos los componentes comunes en los microscopios de fuerza atómica:

- **Cabezal.** Parte que interactúa con la muestra y obtiene las medidas. En el cabezal están integrados diversos elementos:
 - Escáner piezoeléctrico. Este tubo piezoeléctrico permite los movimientos de la nanopunta que, en el caso del microscopio de fuerza atómica Dimension 3100 SPM, se realizan en los tres planos del espacio.
 - Sistema de detección óptico de la detección del cantilever.
 - Sonda. Contiene el *cantilever*, y se coloca justo debajo del escáner piezoeléctrico.
- **Sistema óptico.** La parte óptica que permite localizar la zona de la muestra que se desea rastrear.
- **Platina.** La muestra se coloca sobre la platina y queda fijada por efecto vacío.

- Sistema de control. Formado por las controladoras Nanoscope IIIa y Dimension 3100, y el programa informático.

Los experimentos de espectroscopía de fuerza elaborados con el microscopio de fuerza atómica Dimension 3100 SPM fueron realizados en medio líquido y en el modo de operación de contacto.

3.6. Productos de microscopía de fuerza atómica

3.6.1. Sustratos para muestras

Los sustratos para muestras utilizados con el fin de poder visualizarlas mediante microscopía de fuerza atómica se indican a continuación:

- Discos de mica de grado V-4, mineral de tipo moscovita cortado en forma de discos para colocar las muestras de suspensiones celulares y biofilm. Fueron adquiridos a Spi Supplies (USA), las formas y dimensiones de los discos utilizados fueron: discos cuadrados de 15x15 mm y discos redondos de 15 mm de diámetro.
- Cubreobjetos Thermanox™, con una superficie de poliéster modificada para que sea hidrófila y así facilitar la adherencia celular, utilizados para la formación de biofilm. Fueron adquiridos a Thermo Fischer Scientific Inc. (MA, USA), los cubreobjetos utilizados fueron de 13 mm de diámetro.

- Piezas dentales, para el estudio de formación de biofilm sobre esmalte. Cedidos por la Clínica Odontológica del Campus Universitario de Bellvitge, Universidad de Barcelona.
- Discos de hidroxiapatita, mineral de fosfato de calcio cristalino que compone el esmalte dental, utilizados para el estudio de fuerzas de adhesión. Fueron adquiridos a Clarkson Chromatography Products Inc. (USA), los discos utilizados fueron de 7 mm de diámetro.

3.6.2. Cantilevers y puntas

3.6.2.1. Cantilevers y puntas Modo no-contacto

Los *cantilevers* y puntas ACTA fueron adquiridos a Applied nanostructures (CA, USA), y utilizados para la visualización de superficies celulares y biofilm. Los *cantilevers* están recubiertos por una fina capa de aluminio en la cara opuesta a la punta, para incrementar la calidad de la luz láser reflejada. Las propiedades de las puntas y *cantilevers* ACTA se resumen en las tablas 3.2 y 3.3, respectivamente.

PROPIEDADES		
Punta	Material	Silicio
	Forma	Piramidal
	Altura (µm)	14-16
	Radio curvatura ápice (nm)	< 10

Tabla 3.2 Propiedades de las puntas ACTA.

PROPIEDADES		
<i>Cantilever</i>	Material	Silicio
	Forma	Rectangular
	Largo (μm)	125
	Ancho (μm)	30
	Grosor (μm)	4
	Constante elástica (N/m)	37
	Frecuencia de resonancia (kHz)	300

Tabla 3.3 Propiedades de los *cantilevers* ACTA.

3.6.2.2. *Cantilevers* y puntas Espectroscopía de fuerza

Los *cantilevers* y puntas NP fueron adquiridos a Bruker (MA, USA), y utilizados para medir fuerzas de adhesión. Cada chip contiene cuatro *cantilevers* con recubrimiento de oro para incrementar la reflexión de la luz láser. Las propiedades de las puntas y de cada uno de los *cantilevers* se resumen en las tablas 3.4 y 3.5, respectivamente.

Propiedades		
Punta	Material	Nitruro de silicio
	Forma	Piramidal
	Altura (μm)	2,5 - 8,0
	Radio curvatura ápice (nm)	20

Tabla 3.4 Propiedades de las puntas NP.

		Propiedades			
		A	B	C	D
Cantilever	Material	Nitruro de silicio			
	Forma	Triangular			
	Largo (μm)	120	205	120	205
	Ancho (μm)	25	40	20	25
	Grosor (μm)	0,6	0,6	0,6	0,6
	Constante elástica (N/m)	0,35	0,12	0,24	0,06
	Frecuencia de resonancia (kHz)	65	23	56	18

Tabla 3.5 Propiedades de los *cantilevers* NP.

3.6.2.3. *Cantilevers* para la preparación de sondas celulares

Los *cantilevers* NP-O fueron adquiridos a Bruker (MA, USA), y utilizados para la preparación de las sondas celulares y las medidas de fuerzas de adhesión. Este tipo de *cantilevers* presentan las mismas propiedades que los *cantilevers* NP, pero carecen de nanopunta. De este modo, al inmovilizar las células microbianas al *cantilever*, éstas adquieren la función de punta.

3.7. Visualización de la superficie celular de las cepas de *C. albicans* por microscopía de fuerza atómica

Las visualizaciones de la superficie celular de las diferentes cepas de *C. albicans* se realizaron a partir de cultivos crecidos en medio líquido YPD.

3.7.1. Crecimiento en medio líquido YPD y preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica.

- Las levaduras fueron incubadas en 5 ml de medio líquido YPD a 30°C durante 18 horas en un incubador Aerotron (Infors HT, Switzerland) en agitación a 150 rpm.
- Tras la incubación, se centrifugaron 1 ml de cada cultivo a 7000 rpm durante 10 min utilizando una centrífuga Hermle modelo Z 230 MA y se resuspendieron en agua destilada estéril.
- Una gota de 10 µl de cada suspensión celular fue depositada sobre discos de mica de grado-V4.
- Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y en una atmósfera libre de polvo para su posterior visualización mediante el microscopio de fuerza atómica XE-70.

3.7.2. Condiciones y parámetros de visualización por microscopía de fuerza atómica.

Las condiciones y parámetros para una correcta visualización de las superficies celulares de las cepas de *C. albicans* utilizadas en este estudio, se describen a continuación:

- Todas las visualizaciones se realizaron en seco y a temperatura ambiente.
- El modo de operación fue el modo de no-contacto.
- Los *cantilevers* utilizados fueron rectangulares de silicio y puntas ACTA. Sus características se describen en el apartado 3.6.2.1.
- La velocidad de rastreo varió entre 0,3 Hz y 0,5 Hz.
- Por cada cepa se escogieron al azar 10 células y el área escaneada fue de 36 μm^2 , suficiente como para obtener una imagen de toda la célula.

3.7.3. Estudio de la rugosidad de la superficie celular de las cepas de *C. albicans*.

La observación de las imágenes obtenidas y el análisis de la rugosidad de la superficie celular, se realizaron utilizando los parámetros del software XEI versión 1.8.0. A partir de las imágenes de 36 μm^2 obtenidas, se calculó la rugosidad media (R_a) de un área central de 4 μm^2 para cada célula.

3.7.4. Análisis estadísticos.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R i386 versión 3.0.3. Los datos de rugosidad fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis. En el caso de existir diferencias significativas entre las cepas, se realizaron comparaciones por parejas (6 parejas) con el test de Mann-Whitney U ajustando el p-valor con la corrección de Bonferroni. Aquellos p-valores inferiores a 0.008 fueron considerados estadísticamente significativos.

3.8. Estudio de la formación y estructura del biofilm formado por las cepas de *C. albicans*

Para la formación de biofilm de las cepas de *C. albicans* se siguió el procedimiento descrito por Ramage *et al.* [162].

- Para cada cepa, a partir de un cultivo de 48 horas en placas de medio YNB agar, se inocularon 5 ml de medio líquido YPD
- Todos los cultivos se incubaron a 30°C durante 18 horas en un incubador Aerotron (Infors HT, Switzerland) en agitación a 150 rpm.
- Tras incubación, las células levaduriformes se centrifugaron a 7000 rpm durante 3 min utilizando una centrífuga Hermle modelo Z 230 MA y se lavaron tres veces con solución fosfato salina (PBS), pH 7.4.
- Seguidamente, se resuspendieron en 1 ml de medio líquido RPMI-1640 (Sigma, USA).

Estas suspensiones celulares se utilizaron para testar la formación de biofilm en diferentes sustratos y siguiendo diversos métodos.

3.8.1. Biofilm sobre poliestireno

- A partir de las suspensiones celulares se inocularon a una concentración de 10^6 ufc/ml frascos de cultivo celular estériles (Thermo Fischer Scientific Inc, MA, USA) que contenían 75 ml de medio líquido RPMI-1640.

- Seguidamente, se incubaron a 37°C durante 48 horas en un incubador Aerotron (Infors HT, Switzerland) bajo una agitación suave (60 rpm).
- Una vez formado el biofilm, se recogió una parte con la ayuda de unas *cell scrapers* (Sarstedt AG & Co., Alemania) y se depositaron sobre discos de mica de grado-V4.
- Los biofilms se dejaron secar a temperatura ambiente en una atmósfera libre de polvo.

3.8.2. Biofilm sobre esmalte

- Las piezas dentales fueron lavadas, colocadas en frascos de vidrio y esterilizadas en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- En condiciones estériles, se repartieron 5 ml de medio líquido RPMI-1640 en cada frasco de vidrio que contenían las piezas dentales.
- A partir de las suspensiones celulares se inocularon las piezas dentales a una concentración de 10^6 ufc/ml.
- Seguidamente, se incubaron a 37°C durante 48 horas en un incubador Aerotron (Infors HT, Switzerland) en agitación suave (60 rpm).
- Una vez formado el biofilm sobre la superficie del esmalte, las piezas dentales fueron sacadas de los frascos de vidrio y colocadas en placas de Petri.
- Los biofilms se dejaron secar a temperatura ambiente en una atmósfera libre de polvo para su posterior visualización mediante el microscopio de fuerza atómica XE-70.

3.8.3. Preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica

Biofilms sobre poliestireno

La preparación para visualizar los biofilms obtenidos sobre poliestireno en frascos de cultivo celular estériles, mediante microscopía de fuerza atómica, se realizó de la siguiente manera:

- Previamente, mediante una cinta adhesiva, se deslaminan los discos de mica de grado-V4 para dejar la superficie limpia y lista para una nueva muestra.
- Una vez secados los biofilms sobre los discos de mica, se coloca una cinta adhesiva de doble cara en el lado opuesto a la muestra.
- Sobre un disco metálico se adhiere el disco de mica con ayuda de la cinta adhesiva de doble cara.
- Finalmente, se fija el disco metálico a la platina del microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM mediante magnetismo.

Biofilms sobre esmalte

Por otro lado, la preparación de los biofilms formados sobre piezas dentales para su visualización mediante microscopía de fuerza atómica resulta más sencilla. Una vez secados los biofilms, se colocan cada una de las piezas dentales sobre un disco metálico, con la ayuda de una cinta adhesiva de doble cara. Seguidamente, se coloca el disco metálico con la muestra sobre la platina del microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM.

3.8.4. Condiciones y parámetros de visualización por microscopía de fuerza atómica

Las condiciones y parámetros para una correcta visualización de los biofilms formados por cada una de las cepas de *C. albicans* y sustratos utilizados en este estudio, se describen a continuación:

- Todas las visualizaciones se realizaron en seco y a temperatura ambiente.
- El modo de operación fue el modo de no-contacto.
- Los *cantilevers* utilizados fueron rectangulares de silicio y puntas ACTA. Sus características se describen en el apartado 3.6.2.1.
- La velocidad de rastreo fue de 0,3-0,5 Hz.
- Por cada cepa se rastrearon tres áreas de 900 μm^2 de la superficie de los biofilms formados, tanto sobre poliestireno como sobre esmalte.
- Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software XEI versión 1.8.0. (Park Systems, Corea del Sur).

3.9. Análisis de la rugosidad del biofilm de *C. albicans* y sus mutantes CFEM

Con el fin de estudiar la influencia del tipo de sustrato sobre la formación y estructura de biofilm de las cepas utilizadas de *C. albicans*, se realizó un análisis de la rugosidad de superficie de biofilms formados sobre cubreobjetos de Thermanox™ y sobre esmalte mediante microscopía de fuerza atómica.

3.9.1. Biofilm sobre esmalte

Los biofilms utilizados en este estudio fueron los obtenidos en el apartado 3.8, en el cual también se describe la preparación de estas muestras para microscopía de fuerza atómica.

3.9.2. Biofilm sobre Thermanox™

Para la obtención de biofilms formados sobre cubreobjetos de Thermanox™ se siguió el protocolo descrito a continuación:

- En condiciones asépticas se colocan los cubreobjetos de Thermanox™ de 13 mm de diámetro en placas de cultivo de 24 pocillos que se utilizarán para los experimentos.
- A partir de las suspensiones levaduriformes obtenidas siguiendo el mismo procedimiento que se describe en el apartado 3.8, se inocularon a una concentración de 10^6 ufc/ml las placas de cultivo de 24 pocillos que contenían 2 ml de medio líquido RPMI-1640 y un cubreobjetos de Thermanox™ por pocillo.
- Seguidamente, se incubaron a 37°C durante 48 horas en un incubador Aerotron (Infors HT, Switzerland) en agitación suave (60 rpm).
- Una vez formado el biofilm, se lavaron con agua destilada estéril para eliminar restos de medio y se dejaron secar a temperatura ambiente en una atmósfera libre de polvo.

3.9.3. Preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica.

- Una vez secados los biofilms, se coloca una cinta adhesiva de doble cara en los cubreobjetos de Thermanox™, en el lado opuesto a la muestra.
- Sobre un disco metálico se adhiere el cubreobjetos de Thermanox™.
- Seguidamente, se fija el disco metálico a la platina del microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM mediante magnetismo.

3.9.4. Condiciones y parámetros para el estudio de la rugosidad de superficie mediante microscopía de fuerza atómica

- El modo de operación utilizado fue el modo de No-contacto, en seco y a temperatura ambiente.
- Los *cantilevers* utilizados fueron rectangulares de silicio y puntas ACTA. Sus características se describen en el apartado 3.6.2.1.
- La velocidad de rastreo varió entre 0,4 Hz y 0,7 Hz.
- Se escanearon áreas de 900 μm^2 de los biofilms de cada una de las cepas utilizadas de *C. albicans*, formados tanto sobre esmalte como sobre Thermanox™.
- De los dos materiales utilizados, también fueron escaneadas áreas de 100 μm^2 para analizar la rugosidad de cada tipo de superficie.
- El análisis de la rugosidad de las superficies celulares y de los materiales, se realizó utilizando los parámetros del software XEI versión 1.8.0. Se calculó la rugosidad media (R_a) de cada área escaneada.

3.9.5. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R i386 versión 3.0.3. La normalidad de los datos junto con la homogeneidad de la varianza se determinó con el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene. Seguidamente, se compararon todos los datos con el test *Two-way* ANOVA (dos variable independientes, cepas y materiales). En el caso de existir diferencias significativas se realizaron comparaciones por parejas mediante el test *post hoc* de Tukey. Aquellos p-valores inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

3.10. Estudio de la eficiencia del tratamiento con láser de ER,Cr:YSGG y con láser de Diodo

Con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento endodóntico mediante la utilización de la luz láser, se realizó un estudio *in vitro* en el cual se trataron células de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 con el láser Er,Cr:YSGG y el láser Diodo, ambos utilizados ampliamente en el tratamiento endodóntico.

3.10.1. Láser de Er,Cr:YSGG

El sistema de láser Er,Cr:YSGG (Waterlase MD; Biolase Technology, CA, USA) emite luz a una longitud de onda de 2.780 nm, en pulsos de 140 μ s y 750 μ s, y una tasa de repetición de 10-50 Hz. La luz del láser es transferida desde la fuente a la pieza de mano a través de una fibra óptica. Las puntas utilizadas fueron puntas de fusilamiento radial

(Waterlase MD Endolase RFT), de 25 mm de longitud y 200 μ m de diámetro, diseñadas para tratamiento endodóntico. Para este estudio se aplicaron potencias de 1 W y 2 W a 20 Hz (impulsos/s), por lo que la energía de pulso fue entre 50 mJ y 150 mJ.

3.10.2. Láser de Diodo (por calor)

El sistema de láser diodo (InGaAsP, Ezlase; Biolase Technology, CA, USA) emite a una longitud de onda de 940 nm. Puede funcionar en modo pulsado o continuo, y a una velocidad de repetición de 0.06 ms a 10 s. Las puntas utilizadas fueron puntas de endodoncia (EzTip Endo), de 14 mm longitud y 200 μ m de diámetro. Para este estudio se aplicaron potencias de 1 W y 2 W en modo pulsado, con intervalos de 1.0 ms y una duración del impulso de 1.0 ms.

3.10.3. Tratamiento con láser de Er,Cr:YSGG y láser de Diodo de suspensiones celulares de *E. faecalis*

- En cada experimento, se partió de un único cultivo de *E. faecalis* obtenido tras una incubación *overnight* a 37°C en 10 ml de medio líquido TSB.
- El cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min utilizando una centrífuga Hermle modelo Z 230 MA.
- Seguidamente, el sedimento fue resuspendido en agua destilada estéril.
- A partir de esta suspensión bacteriana, se separaron varias alícuotas de 100 μ l en microtubos *Eppendorf* (PCR-02-A).

- Las condiciones experimentales para cada tratamiento fueron las siguientes:
 - Alícuota control sin tratar.
 - Irradiación con láser Er,Cr:YSGG durante 30 s a 1 W de potencia
 - Irradiación con láser Er,Cr:YSGG durante 30 s a 2 W de potencia.
 - Irradiación con láser Diodo durante 30 s a 1 W de potencia.
 - Irradiación con láser Diodo durante 30 s a 2 W de potencia.

3.10.4. Visualización por microscopía de fuerza atómica

Una vez tratadas las diversas alícuotas celulares, se procedió a la inmovilización de las células bacterianas y preparación de las muestras para su posterior visualización mediante microscopía de fuerza atómica.

3.10.4.1. Preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica

- Previamente, mediante una cinta adhesiva, se deslaminaron los discos de mica de grado-V4 para dejar la superficie limpia y lista para una nueva muestra.
- Se depositaron 10 μ l de cada suspensión bacteriana tratada y no tratada sobre los discos de mica.
- Seguidamente, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente en una atmósfera libre de polvo.

- Una vez secas las preparaciones, se coloca una cinta adhesiva de doble cara en los discos de mica, en el lado opuesto a la muestra.
- Seguidamente, se adhiere el disco de mica sobre un disco metálico.
- Finalmente, se fija el disco metálico a la platina del microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM mediante magnetismo.

3.10.4.2. Condiciones y parámetros de visualización por microscopía de fuerza atómica

- Todas las visualizaciones se realizaron en seco y a temperatura ambiente.
- El modo de operación fue el modo de no-contacto.
- Los *cantilevers* utilizados fueron rectangulares de silicio y puntas ACTA. Sus características se describen en el apartado 3.6.2.1.
- La velocidad de rastreo varió entre 0,3 Hz y 0,7 Hz.
- En cada muestra se escanearon áreas de 100 μm^2 , 25 μm^2 y 6,25 μm^2 .

3.10.5. Estudio de la rugosidad de superficie de *E. faecalis* tratados y no tratados

La observación de las imágenes obtenidas y el análisis de la rugosidad de la superficie celular, se realizaron utilizando los parámetros del software XEI versión 1.8.0. Se calculó la rugosidad media (R_a) de cada área escaneada y para cada tratamiento.

3.10.6. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R i386 versión 3.0.3. Los datos de rugosidad fueron transformados con la transformación de raíz cuadrada para que siguieran una distribución normal y presentaran homogeneidad de la varianza, que se determinaron con el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Fligner-Killeen. Seguidamente, se compararon todos los datos con el test *One-way* ANOVA. En el caso de existir diferencias significativas se realizaron comparaciones por parejas mediante el test *post hoc* de Tukey. Aquellos p-valores inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

3.11. Estudio de la eficiencia del tratamiento con terapia fotodinámica

Para evaluar la eficiencia de la terapia fotodinámica en eliminar microorganismos, como alternativa al tratamiento endodóntico convencional, se realizó un estudio *in vitro* en el cual se trataron biofilms formados por la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 con diferentes tipos de luz y fotosensibilizadores.

3.11.1. Luz LED (*Light-emitting-diode*) y azul de toluidina O

La lámpara de diodo emisor de luz FotoSan® (CMS Dental, Copenhagen, Denmark) emite una luz en el espectro rojo con una longitud de onda de 628 nm. El sistema LED FotoSan tiene una

potencia de salida de 1000 mW con una intensidad de 2000 mW/cm² y una densidad de energía de 20 J/cm² durante 10 s. El fotosensibilizador activo utilizado fue el azul de toluidina O (TBO) (FotoSan®; CMS Dental, Copenhagen, Denmark) a una concentración de 0,1 mg/ml con una baja viscosidad.

3.11.2. Láser de Diodo frío y azul de metileno

El equipo de láser de diodo Periowave™ (Ondine Biopharma, Vancouver, Canada) emite a una longitud de onda de 670 nm. Cuenta con una potencia de salida máxima de 140 mW y una densidad de energía de 21 J/cm². El fotosensibilizador utilizado fue el cloruro de tetrametilionina (azul de metileno, MB) (Periowave™ (Ondine Biopharma, Vancouver, Canada) a una concentración de 0.05 mg/ml, suspendido en una solución de tampón fosfato con hidroximetilcelulosa como agente de viscosidad mucoadhesivo.

3.11.3. Preparación del sustrato para la formación de biofilm

Con el fin de favorecer la adhesión de las células bacterianas a la superficie del sustrato y la formación de biofilm, los cubreobjetos de Thermanox™ fueron recubiertos por una película de poli-L-lisina siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- En condiciones asépticas se colocan los cubreobjetos de Thermanox™ de 13 mm de diámetro en los pocillos de las placas de cultivo de 24 pocillos que se utilizarán para los experimentos.

- A continuación se colocan 200 µl de solución de poli-L-lisina a la concentración de 0.1 mg/ml sobre cada cubreobjetos de Thermanox™.
- Se incuba durante 30 minutos a 37°C para crear la película de poli-L-lisina sobre la superficie de los sustratos.
- Tras la incubación, se aspira la solución de poli-L-lisina y se limpian las superficies un par de veces con agua destilada estéril, agitando ligeramente entre lavados.
- Dejar secar las superficies en condiciones asépticas durante 2 horas.

Una vez finalizado este protocolo, las superficies de los cubreobjetos de Thermanox™ están preparadas para la fijación celular y formación de biofilm.

3.11.4. Formación y obtención de biofilms de *E. faecalis*

- Para la formación de biofilms se partió de un cultivo *overnight* de 20 ml de medio TSB incubado a 37°C en un incubador Aerotron (Infors HT, Switzerland) en agitación orbital a 250 rpm.
- Seguidamente, se inocularon a una concentración final de 10⁶ célula/ml, placas de cultivo de 24 pocillos que contenían por pocillo 2 ml de medio TSB y cubreobjetos de Thermanox™ recubiertos de poli-L-lisina.
- Los biofilms se obtuvieron tras 24 horas de incubación a 37°C en un incubador Aerotron (Infors HT, Switzerland) en agitación suave (60 rpm).

3.11.5. Tratamiento fotodinámico de los biofilms obtenidos de *E. faecalis*

- Una vez formados los biofilms sobre la superficie de los cubreobjetos de Thermanox™, se lavaron gentilmente con agua destilada estéril con el fin de eliminar las células no adheridas.
- Seguidamente, se realizaron los tratamientos sobre los biofilms con los diferentes tipos de luz y fotosensibilizadores. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:
 - Biofilms sin tratar utilizados como control.
 - Biofilms sensibilizados con azul de toluidina durante 1 min en oscuridad.
 - Biofilms irradiados con LED durante 30 s.
 - Biofilms sensibilizados con azul de toluidina durante 1 min en oscuridad e irradiado con luz LED durante 30 s.
 - Biofilms sensibilizados con azul de metileno durante 1 min en oscuridad.
 - Biofilms irradiados con láser diodo durante 30 s.
 - Biofilms sensibilizados con azul de metileno durante 1 min en oscuridad e irradiados con el láser diodo durante 30 s.
- Al finalizar los tratamientos, todos los biofilms se volvieron a lavar gentilmente con agua destilada estéril para eliminar los restos de las soluciones de fotosensibilizadores.
- Posteriormente, se dejaron secar a temperatura ambiente y en una atmósfera libre de polvo.

3.11.6. Visualización por microscopía de fuerza atómica

Una vez tratados los biofilms, se procedió a su inmovilización y preparación para su posterior visualización mediante microscopía de fuerza atómica.

3.11.6.1. Preparación de las muestras para microscopía de fuerza atómica

- Una vez secados los biofilms, se coloca una cinta adhesiva de doble cara en los cubreobjetos de Thermanox™, en el lado opuesto a la muestra.
- Seguidamente, sobre un disco metálico se adhiere el cubreobjetos de Thermanox™.
- Finalmente, se fija el disco metálico a la platina del microscopio de fuerza atómica XE-70 SPM mediante magnetismo.

3.11.6.2. Condiciones y parámetros de visualización por microscopía de fuerza atómica

- Todas las visualizaciones se realizaron en seco y a temperatura ambiente.
- El modo de operación fue el modo de no-contacto.
- Los *cantilevers* utilizados fueron rectangulares de silicio y puntas ACTA. Sus características se describen en el apartado 3.6.2.1.
- La velocidad de rastreo varió entre 0,3 Hz y 0,7 Hz.
- En cada muestra se escanearon áreas de 100 μm^2 , 25 μm^2 y 6,25 μm^2 .

3.11.7. Estudio de la rugosidad de superficie de biofilms de *E. faecalis* tratados y no tratados

La observación de las imágenes obtenidas y el análisis de la rugosidad de la superficie celular de los biofilms, se realizaron utilizando los parámetros del software XEI versión 1.8.0. Se calculó la rugosidad media (R_a) de cada área escaneada y para cada tratamiento.

3.11.8. Estudio de la viabilidad bacteriana en biofilms mediante CLSM

El estudio de viabilidad bacteriana en los biofilms de *E. faecalis* tratados se realizó mediante la tinción de fluorescencia *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit* y la posterior visualización por CLSM, técnica que permite la obtención de imágenes ópticas de elevada resolución.

3.11.8.1. Preparación de las muestras

- Una vez formados los biofilms sobre la superficie de los cubreobjetos de Thermanox™, se lavaron gentilmente con agua destilada estéril con el fin de eliminar las células no adheridas.
- Seguidamente, se realizaron los tratamientos sobre los biofilms con los diferentes tipos de luz y fotosensibilizadores.
- Al finalizar los tratamientos, todos los biofilms se volvieron a lavar gentilmente con agua destilada estéril para eliminar los restos de las soluciones de fotosensibilizadores.

- A continuación, se incubaron los biofilms con la solución de tinción *LIVE/DEAD BacLight viability kit* (Molecular Probes Inc.) durante 15 min en oscuridad. La solución de tinción contiene en 1 ml de NaCl al 0.9% una mezcla de 1.5 μ l de SYTO9 y 1.5 μ l de yoduro de propidio. SYTO9 penetra tanto en las bacterias con las membranas intactas como en aquellas que tienen las membranas dañadas, mientras que el yoduro de propidio solo penetra en las bacterias con las membranas dañadas, provocando la reducción de SYTO9 cuando los dos colorantes están presentes.
- Transcurridos los 15 min de incubación, los biofilms se volvieron a lavar gentilmente con agua destilada estéril para eliminar los restos de la solución de tinción *LIVE/DEAD*[®].
- Finalmente, los discos de Thermanox[™] se depositaron sobre un portaobjetos, colocando una gota de aceite de montaje sobre los biofilms y cubriéndolos con un cubreobjetos.

3.11.8.2. Condiciones y parámetros de visualización por CLSM

- Las imágenes de los biofilms doblemente teñidos fueron adquiridas utilizando el CLSM Leica TCS-SL con detección espectral sin filtro (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).
- El microscopio CLSM está equipado con un láser de argón 488 nm, y láser He/Ne 543 nm y 633 nm (Centres Científics i Tecnològics de Barcelona, Barcelona, Spain).
- Los biofilms fueron observados utilizando un objetivo de inmersión X63, de apertura numérica 1.4, y con zoom 1.

- Las imágenes obtenidas tienen un tamaño de *voxel* de 0.23x0.23x0.4 μm y una resolución de 1024x1024 pixels.
- El tamaño de *pinhole* se mantuvo al ajuste mínimo (1.0-1.08 AU).
- La saturación de las imágenes se evitó mediante la reducción de la ganancia y el desplazamiento en la señal más brillante. Para cada canal se llevó a cabo un rastreo secuencial.

3.11.8.3. Enumeración de bacterias viables

Una vez obtenidas las imágenes de CLSM de los biofilms tratados, se analizaron con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Md, USA). Para cada imagen se realizó un *threshold* y se aplicó una separación de cuencas para poder diferenciar entre una o dos células bacterianas. A partir del número total de bacterias se obtuvieron los porcentajes de bacterias viables y muertas tras cada tratamiento.

3.11.9. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R i386 versión 3.0.3.

Los datos de rugosidad fueron transformados con la transformación de raíz cuadrada para que siguieran una distribución normal y presentaran homogeneidad de la varianza, que fueron determinados con el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene. Seguidamente, se compararon todos los datos con el test *One-way* ANOVA. En el caso de existir diferencias significativas se realizaron

comparaciones por parejas mediante el test *post hoc* de Tukey. Aquellos p-valores inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

En el caso de los porcentajes de bacterias vivas y muertas, al tratarse de porcentajes, la transformación que se aplicó para seguir una distribución normal fue la de arcoseno. Seguidamente, se analizaron los datos estadísticamente con el test de Kolmogorov-Smirnov, test de Levene y el test *One-Way* ANOVA. Finalmente las comparaciones por parejas se realizaron con el método *post hoc* de Tukey. Aquellos p-valores inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

3.12. Fuerzas de adhesión de *C. albicans* en Thermanox™ y hidroxiapatita

Para medir las fuerzas de adhesión del biofilm formado por cada una de las cepas de *C. albicans* utilizadas a diferentes tipos de sustratos, se utilizó la técnica de AFM denominada Espectroscopía de Fuerza. Además, con el fin de estudiar cómo una superficie puede influenciar en la adhesión celular y formación del biofilm, los diferentes sustratos se testaron con ausencia o presencia de un recubrimiento de saliva en su superficie.

3.12.1. Condiciones de crecimiento y formación de biofilm

- A partir de las suspensiones levaduriformes obtenidas siguiendo el mismo procedimiento que se describe en el apartado 3.8, se inocularon a una concentración de 10^6 ufc/ml placas de cultivo de 12 pocillos que contenían 5 ml de medio líquido RPMI-1640 por pocillo.
- Seguidamente, se incubaron a 37°C durante 48 horas en un incubador Aerotron (Infors HT, Switzerland) en agitación suave (60 rpm).
- Una vez formado el biofilm, se aspiró el medio mediante una pipeta Pasteur de plástico estéril.
- A continuación, con la ayuda de una pipeta Pasteur y 1 ml de solución de PBS se disgregó el biofilm y se separó del fondo del pocillo. El biofilm disgregado fue aspirado y transferido a un tubo de centrifuga de 30 ml.
- El paso anterior se repitió dos veces más, para asegurar que se recogió gran parte del biofilm.
- Cada biofilm se centrifugó a 5000 g durante 5 minutos a 10°C , y se lavaron dos veces con solución de PBS.
- Finalmente, se resuspendieron los biofilms en agua destilada estéril para evitar cualquier interacción entre las soluciones de PBS y de poli-L-lisina. Inmediatamente, se utilizaron las suspensiones de biofilm para la preparación de las sondas celulares.

3.12.2. Materiales y recubrimiento con saliva

Los materiales utilizados para evaluar las fuerzas de adhesión fueron cubreobjetos de Thermanox™ y discos de hidroxiapatita, descritos anteriormente en el apartado 3.4.1.

Para el recubrimiento de las superficies de los materiales mencionados anteriormente se utilizó saliva humana liofilizada, cuya recolección y preparación está descrita por Mei *et al.* [48]. El procedimiento para el recubrimiento con saliva se describe brevemente a continuación:

- Al inicio de cada experimento, la saliva liofilizada fue disuelta en tampón de adhesión a una concentración de 1.5 g/l siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2.
- Los cubreobjetos de Thermanox™ y los discos de hidroxiapatita, se sumergieron en 2 ml de saliva reconstituida en placas de cultivo de 24 pocillos.
- Seguidamente, se incubaron a 4°C durante 16 horas sin agitación, para crear una película de saliva sobre la superficie de cada material.
- Tras incubación, los materiales recubiertos con saliva se lavaron con agua destilada estéril e inmediatamente fueron utilizados para los experimentos de Espectroscopía de Fuerza.

3.12.3. Preparación de las sondas celulares de AFM con *C. albicans*

La preparación de las sondas celulares se realizó mediante un micromanipulador (Leica, Wetzlar, Alemania) y se utilizaron

cantilevers triangulares de nitruro de silicio NP-O, concretamente del tipo C, cuyas características se detallan en el apartado 3.6.2.2. Para la obtención de las sondas celulares, estos *cantilevers* carecen de nanopunta, puesto que será la célula microbiana la que adquirirá esta función. El procedimiento para la preparación de las sondas celulares fue el siguiente:

- El *cantilever* se sumergió en una gota de solución de poli-L-lisina durante 1 minuto, con el fin de cargar positivamente su superficie.
- A continuación, se dejó secar el *cantilever* en aire durante 2 minutos.
- Seguidamente, el *cantilever* fue sumergido durante 90 segundos en una gota de biofilm resuspendido en agua destilada, para facilitar la inmovilización en la superficie del *cantilever* de las células que proviene del biofilm.
- Finalmente, el *cantilever* fue depositado sobre un trozo de papel húmedo para evitar su secado hasta la realización de los experimentos de adhesión.

Todas las sondas celulares fueron preparadas antes de cada experimento y utilizadas inmediatamente.

3.12.4. Condiciones y parámetros para las medidas de fuerzas de adhesión

Los experimentos de espectroscopía de fuerza fueron realizados a 20°C en solución de PBS mediante el microscopio de fuerza atómica Dimension 3100, siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- Las medidas de fuerza se realizaron en modo de contacto, a una velocidad de rastreo de 2 Hz, bajo una fuerza de carga del cantilever de 10 nN.
- Para cada sonda celular, material y presencia o ausencia de saliva, se realizaron 10 medidas de fuerza en 3 puntos diferentes escogidos al azar de cada superficie, donde los tiempos de contacto fueron 0 s y 60 s.
- Como resultado se generaron curvas de fuerza-distancia donde se registraron los datos de desviación del *cantilever*.
- Mediante la ley de Hooke, cada desviación del *cantilever* (d) es transformada en valor de fuerza (nN), teniendo en cuenta la constante elástica (k) de cada *cantilever* utilizado:

$$F = -kd$$

La constante elástica de cada *cantilever* fue determinada mediante el método termal [193].

- El software Nanoscope Analysis versión 1.40 (Bruker) permitió el análisis de las curvas de fuerza-distancia resultantes y la obtención de los valores de las fuerzas de adhesión.

Para evitar contaminaciones, se preparó una sonda celular por cada cepa, tipo de sustrato, y ausencia o presencia de saliva.

Con el fin de disponer de un control de que realmente se estaban midiendo fuerzas de adhesión celular, se realizaron experimentos de espectroscopía de fuerza para cada material y tipo de superficie utilizando *cantilevers* y puntas NP, en ausencia de células microbianas. Se realizaron 10 medidas de fuerza en 3 puntos diferentes escogidos al

azar de cada superficie y tipo de material, donde el tiempo de contacto fue de 0 s. El valor de las fuerzas obtenidas es el resultado de la interacción entre la nanopunta y el sustrato.

3.12.5. Estudio de la rugosidad de superficie de materiales

El microscopio de fuerza atómica Dimension 3100 también se utilizó para determinar la rugosidad de superficie de los dos tipos de materiales utilizados, en presencia o ausencia de saliva. Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

- Las medidas de rugosidad se realizaron a 20°C en solución de PBS, modo de contacto y a una velocidad de rastreo de 1.5 Hz.
- Para cada material y tipo de superficie, se rastrearon tres áreas al azar de 100 μm^2 .
- Se utilizaron los parámetros del software Nanoscope Analysis versión 1.40 (Bruker) para realizar el análisis de la rugosidad de las superficies. Se calculó la rugosidad media (R_a) de cada área escaneada y para cada tipo de superficie.

3.12.6. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R i386 versión 3.0.3.

Los datos de fuerzas de adhesión fueron transformados con la transformación de raíz cuadrada para que siguieran una distribución normal y presentaran homogeneidad de la varianza, que se

determinaron con el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene. Seguidamente, se compararon todos los datos con el test *Two-way* ANOVA (dos variables independientes, cepas y superficies). En el caso de existir diferencias significativas se realizaron comparaciones por parejas mediante el test *post hoc* de Tukey. Aquellos p-valores inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Con el fin de comparar los datos de rugosidad obtenidos de las superficies de los materiales, se aplicó la transformación de raíz cuadrada para seguir una distribución normal. Seguidamente, se analizaron los datos estadísticamente con el test de Kolmogorov-Smirnov, test de Levene y el test *One-way* ANOVA. Finalmente, las comparaciones por parejas se realizaron con el método *post hoc* de Tukey. Aquellos p-valores inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La microscopia de fuerza atómica permite estudiar las superficies de materiales biológicos a escala nanométrica y obtener imágenes de elevada resolución de la topografía de la muestra. En este trabajo, con el fin de estudiar la eficacia de distintos tipos de luz láser, cada vez más ampliamente utilizados en el tratamiento endodóntico, y evaluar el efecto de la terapia fotodinámica en la eliminación de microorganismos, la microscopía de fuerza atómica ha resultado de gran utilidad en la observación y evaluación de las lesiones producidas en la superficie externa celular de *E. faecalis* cuando las bacterias, en distintas condiciones, fueron tratadas en modos distintos. Ello se consiguió mediante la combinación de datos procedentes de la visualización de cambios en la morfología celular y del análisis de la rugosidad de superficie. Por otro lado, la utilización de esta poderosa técnica ha permitido observar, caracterizar y explorar tanto la superficie celular de distintas cepas de *C. albicans*, como la estructura del biofilm que forman. De este modo, se han desarrollado diversos estudios en los que se ha evaluado la rugosidad de superficie, parámetro que nos ayuda a caracterizar una superficie; se ha observado la formación, estructura y complejidad de los diferentes biofilms obtenidos; explorado la influencia de diferentes tipos de sustrato en la formación de biofilms; y analizado las fuerzas de adhesión de las distintas cepas de *C. albicans* utilizadas ante diversos sustratos mediante las técnicas de AFM y de espectroscopía de fuerza.

4.1. Estudio de la eficiencia del tratamiento con láser Er,Cr:YSGG y con láser Diodo

En este apartado, se ha pretendido comparar la eficiencia de los láseres de Er,Cr:YSGG y de Diodo evaluando los daños infligidos a las bacterias tratadas mediante microscopía de fuerza atómica, permitiendo la visualización de lesiones superficiales y cambios en la morfología celular producidos en *E. faecalis* tras la exposición a la luz láser. Ambos sistemas de luz láser se utilizan en medicina oral y dermatología para fines quirúrgicos y por sus propiedades antimicrobianas. En 2010 se demostró que Er,Cr:YSGG podría ser útil en la odontología para la desinfección de los conductos radiculares experimentalmente colonizados [194]. Por otra parte, la radiación láser de diodo da resultados similares, por lo que también es útil para los mismos fines [195].

Las técnicas de microscopía han sido utilizadas en odontología para caracterizar las superficies del esmalte, dentina y demás superficies de materiales odontológicos, visualizar los túbulos dentinarios, así como también para analizar cuantitativamente los cambios morfológicos en estas superficies después de realizar un tratamiento. La microscopía electrónica de barrido (SEM) ha permitido examinar la dentina, la visualización de conductos radiculares colonizados por *E. faecalis*, evaluar el efecto de varios tipos de láser sobre las superficies de la raíz y del esmalte, y también el estudio del efecto bactericida de los tratamientos con láser [196–200]. Mediante la técnica de microscopía confocal láser de barrido (CLSM), varios investigadores han podido analizar la superficie del esmalte y de la dentina después de tratar

estas superficies con láser [201, 202]. La microscopía de fuerza atómica ha sido introducida recientemente en odontología como una herramienta sensible y no destructiva, para caracterizar la superficie de la dentina e investigar sus propiedades mecánicas, así como también para visualizar las superficies de tejidos dentales tras ser tratados con luz láser [203–205].

La técnica de AFM permite la visualización de las superficies microbianas tanto en medio seco como en líquido. La visualización en líquido resulta ser más complicada desde el punto de vista experimental, debido a la mala adhesión de las células microbianas al sustrato. Durante el rastreo, las células poco adheridas se pueden desprender e interactuar con la punta, dando un perfil que no corresponde a la topografía de la muestra, lo que hace disminuir la resolución y la calidad de las imágenes obtenidas [206]. Por el contrario, la preparación de muestras para la visualización en seco es más sencilla, además de que en este modo de obtención de imágenes se pueden apreciar con mayor resolución la morfología general y las características topográficas de las superficies de las células microbianas, rasgos que no se distinguen en las visualizaciones en medio líquido [207, 208]. En este estudio, las visualizaciones de AFM fueron realizadas en seco, ya que este modo de obtención de imágenes es comúnmente utilizado para evaluar cambios morfológicos en las superficies microbianas causadas por varios tratamientos [209, 210]. Para asegurarnos que el proceso de secado de las muestras no altera la morfología celular, las imágenes de *E. faecalis* sin tratar sirvieron

también como control dado que no revelaron cambios morfológicos ni incrementos en los valores de nanorugosidad de superficie.

En la figura 4.1 se muestran las imágenes de topografía y amplitud obtenidas mediante AFM, después de tratar *E. faecalis* con láser de Er,Cr:YSGG a 1 W y 2 W de potencia. Las imágenes de topografía nos proporcionaron información acerca de las diferencias en la superficie y la estructura de las células bacterianas, mientras que las imágenes de amplitud permitieron una mejor observación de ciertas características y rasgos finos de las superficies [211]. Como se puede observar en la figura 4.1, tanto la morfología como la superficie celular resultaron alteradas después del tratamiento con láser. Las imágenes de topografía de 100 μm^2 de tamaño de rastreo, fueron adquiridas con el fin de obtener una visión general de la muestra y así poder localizar la zona a analizar, en estas imágenes no es posible distinguir alteraciones en las superficies bacterianas. En las imágenes de amplitud de 25 μm^2 y 6,25 μm^2 de tamaño de rastreo, se pueden observar con mayor detalle las alteraciones en la morfología celular y distorsiones en las superficies bacterianas. Las células no tratadas de *E. faecalis* aparecen con la morfología típica de cocos (Fig. 4.1a). Por el contrario, después del tratamiento con láser de Er,Cr:YSGG a 1 W (Fig. 4.1b) y 2 W de potencia (Fig. 4.1c) se observaron cambios en la morfología de la superficie y signos de lisis celular, como por ejemplo estrías en la superficie celular, destrucción de la pared bacteriana y pérdida de la típica morfología cocoide. Además, también se puede observar pérdida del contenido intracitoplasmático en las células tratadas a 2 W de potencia (Fig. 4.1c), lo que indica que el efecto es

dependiente de la dosis, es decir que el láser de Er,Cr:YSGG a 2 W provoca más daños a las células bacterianas que a 1 W de potencia.

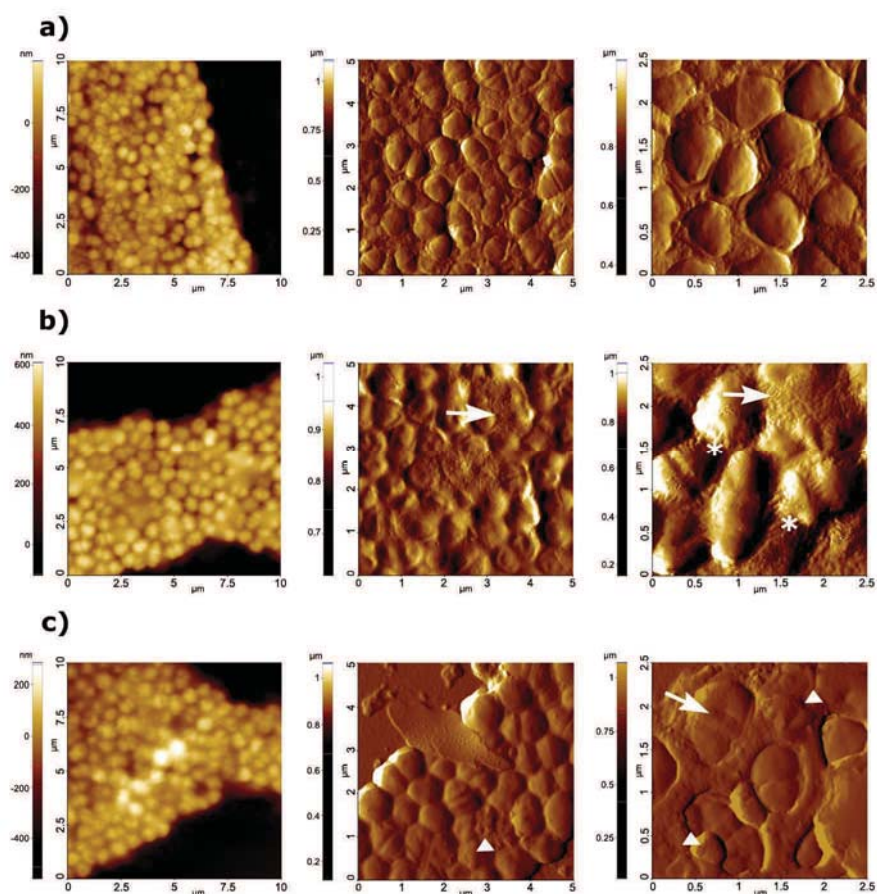


Figura 4.1 Imágenes de AFM de *E. faecalis* sin tratar (a), tras tratamiento con láser Er,Cr:YSGG a 1W (b) y a 2W de potencia (c). La primera columna corresponde a las imágenes de topografía, mientras que las otras dos columnas corresponden a las imágenes de amplitud. Las estrías son representadas por asteriscos, la destrucción de la pared bacteriana o pérdida de la morfología celular típica están indicadas mediante flechas, y las fugas de contenido intracelular están representadas por triángulos. Tamaño de rastreo $100 \mu\text{m}^2$, $25 \mu\text{m}^2$ y $6.25 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

Por otra parte, las imágenes obtenidas por AFM de células de *E. faecalis* tratadas con láser de diodo a 1 W y 2 W de potencia se

Resultados y Discusión

muestran en la figura 4.2. En las imágenes de AFM se pueden observar la aparición de estrías en la superficie celular, pérdida de contenido intracitoplasmático y pérdida de la morfología típica de *E. faecalis*, como resultado de ambos tratamientos. Visualizando mediante AFM la superficie de las células tratadas a un tamaño de rastreo más pequeño ($6,25 \mu\text{m}^2$), se pueden apreciar claramente algunas vesículas y perturbaciones a lo largo de la superficie de las células bacterianas que probablemente constituyen otro signo de lisis bacteriana. Las imágenes de AFM muestran que el láser de diodo puede causar severos daños a *E. faecalis*, tanto a 1 W (Fig. 4.2a) como a 2 W (Fig. 4.2b) de potencia.

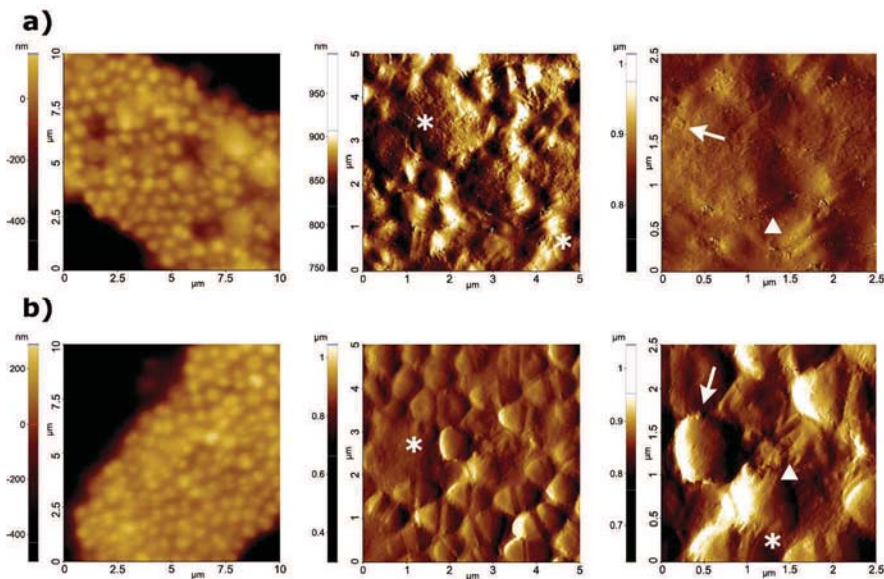


Figura 4.2 Imágenes de AFM de *E. faecalis* tras tratamiento con láser de diodo a 1 W (a) y a 2 W de potencia (b). La primera columna corresponde a las imágenes de topografía, mientras que las otras dos columnas corresponden a las imágenes de amplitud. Las estrías y la pérdida de la morfología celular típica están representadas por asteriscos, las vesículas se indican mediante flechas, y las perturbaciones de la forma celular están representadas por triángulos. Tamaño de rastreo $100 \mu\text{m}^2$, $25 \mu\text{m}^2$ y $6,25 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

Analizando y observando las imágenes adquiridas mediante AFM de suspensiones celulares tratadas de *E. faecalis*, se hizo evidente que ambos tipos de láser causan daños severos en la superficie de este microorganismo, cambios en la morfología celular afectando al tamaño y la forma de la célula, y además, se pudieron observar diversos signos de lisis celular. Lee *et al.* [200], mediante SEM, observaron cambios morfológicos en *Streptococcus mutans* tras un tratamiento con láser de diodo a varias potencias. Los daños severos en las células bacterianas se relacionaron con altas potencias de irradiación; las imágenes obtenidas mediante SEM revelaron cambios en las bacterias tratadas tales como la pérdida de sus bandas de pared, desintegración y fusión de células, y formación de poros en la pared celular.

Un parámetro relevante para caracterizar la morfología de una superficie es la determinación de la rugosidad de superficie (R_a), que representa la rugosidad media aritmética [212]. Las medidas de rugosidad se realizaron utilizando los parámetros proporcionados por el software XEI versión 1.8.0 a partir de las imágenes de topografía de AFM obtenidas previamente, para cada tamaño de rastreo (100 μm^2 , 25 μm^2 y 6,25 μm^2). En la figura 4.3 se representan los valores de la rugosidad de superficie (R_a) de *E. faecalis* sin tratar, y tras el tratamiento con Er,Cr:YSGG y con diodo, ambos a 1 W y 2 W de potencia. Una alteración drástica en la forma de las células, la lisis celular y la pérdida de contenido intracelular provocan un cambio en la rugosidad de la superficie de la muestra que puede ser detectado por AFM. De este modo, con los datos obtenidos, se puede observar

que la rugosidad de superficie aumenta en gran medida después del tratamiento con láser.

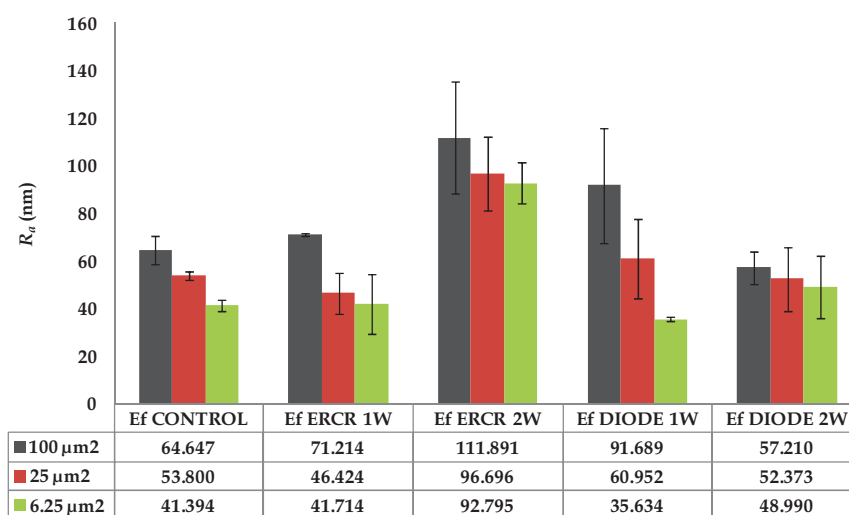


Figura 4.3 Representación gráfica de la rugosidad de superficie (R_a), según los tamaños de rastreo, los tipos de fuente de luz láser y las potencias utilizadas. Los valores obtenidos se muestran en la tabla, y las barras representan los valores del error estándar del promedio.

Al tratar de correlacionar las imágenes de AFM obtenidas y los datos de rugosidad superficial con el efecto de los tratamientos sobre *E. faecalis*, el láser de Er,Cr:YSGG a 2 W de potencia provocó unas alteraciones morfológicas en las células bacterianas que fueron más evidentes. Concretamente, cuando se comparan todas las imágenes de amplitud de AFM de 25 μm² y 6,25 μm², se pueden observar cambios notables en la superficie y morfología celular de *E. faecalis* tratado con Er,Cr:YSGG a 2 W, así como también signos indicativos de lisis celular. Además, en comparación con los otros tratamientos realizados en este estudio, los datos de rugosidad de superficie obtenidos tras la irradiación con Er,Cr:YSGG a 2 W fueron los más elevados, siendo

más remarcada esta diferencia analizando la rugosidad en las imágenes de AFM de 6,25 μm^2 de tamaño de rastreo.

Las diferencias entre el tratamiento con Er,Cr:YSGG a 2 W de potencia y el resto de los tratamientos ensayados fueron evidentes (p-valor < 0.05), lo que sugiere que podría ser el tratamiento más eficaz para eliminar y erradicar microorganismos. Los efectos producidos por los tratamientos con Er, Cr: YSGG a 1 W, láser de diodo a 1W y a 2 W de potencia, fueron casi idénticos a nivel de modificaciones inducidas en la superficie y forma celular, y en lo que respecta a variaciones en la rugosidad de superficie. Los p-valores obtenidos de las comparaciones por parejas se muestran en la tabla 4.1.

	CONTROL	ERCR 1W	ERCR 2W	DIODE 1W
CONTROL	----			
ERCR 1W	0.999	----		
ERCR 2W	<i>0.029</i>	<i>0.023</i>	----	
DIODE 1W	0.986	0.995	<i>0.007</i>	----
DIODE 2W	0.993	0.983	<i>0.038</i>	0.857

Tabla 4.1 Múltiples comparaciones de los datos de rugosidad obtenidos, correspondientes a las imágenes de AFM de 6,25 μm^2 de tamaño de rastreo. Los p-valores estadísticamente significativos se muestran en *cursiva*.

Los sistemas de láser utilizados en este estudio tienen el mismo efecto fototérmico a pesar de que difieren en la interacción con el tejido diana. Er,Cr:YSGG es absorbido por el agua, mientras que la absorción del láser de diodo por agua resulta ser casi nula. Además, el agua se vaporiza debido a un efecto fototérmico y la expansión del vapor de agua genera un efecto fotomecánico que podría eliminar la

capa residual en la superficie de la dentina, y también podría perturbar las bacterias de las zonas intratubulares [213]. Por el contrario, el láser de diodo es poco absorbido por las estructuras dentales, lo que facilita que el efecto térmico de la radiación se transmita en profundidad a través de la dentina con una baja interacción con esta, permitiendo un mayor efecto fotodestructivo sobre los microorganismos presentes en áreas más inaccesibles de la red tubular [214]. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que Er,Cr:YSGG fue más eficiente en provocar daños y lesiones en bacterias que el láser de diodo, a pesar de que varios estudios han reportado que el láser de diodo presenta un mayor efecto bactericida [104, 113]. Una posible explicación para un mejor efecto de Er,Cr:YSGG obtenido en este estudio podría estar relacionada con el hecho de que todos los experimentos se llevaron a cabo con suspensiones bacterianas, el alto contenido en agua pudo haber favorecido la eficacia del láser de Er,Cr:YSGG. Otro hecho que ha podido afectar al efecto del láser de diodo es que fue utilizado en modo pulsado y no en modo continuo, puesto que es el modo utilizado más comúnmente por los odontólogos para evitar daños en los tejidos que pudieran deberse a incrementos de la temperatura.

Para evaluar el efecto antimicrobiano de los sistemas de láser, la mayoría de los autores han diseñado estrategias de colonización experimental de canales radiculares, seguido de la recuperación de microorganismos después del tratamiento y la enumeración de células bacterianas viables. En todos los casos, el cultivo de microorganismos para enumerar supervivientes se realiza en medios bacteriológicos

ricos tales como agar sangre [215]. La gran variedad de nutrientes que contiene el medio de agar sangre favorece el crecimiento de la mayoría de las bacterias, lo que facilita la reaparición de ciertas lesiones que no son suficientes para inducir la muerte celular. Sin embargo, las condiciones de crecimiento, disponibilidad de nutrientes, y características ambientales en el interior del canal radicular son mucho más desfavorables para el crecimiento microbiano. Por lo tanto, la enumeración de bacterias viables en un medio artificial puede subestimar el efecto antibacteriano real del láser, puesto que, hasta cierto punto, las células bacterianas con un daño moderado pueden llegar a reparar las lesiones inducidas por el tratamiento y multiplicarse, hecho que probablemente nunca va a suceder en un canal radicular. En este estudio, hemos sido capaces de visualizar lesiones superficiales en *E. faecalis* mediante AFM justo después del tratamiento y realizar un estudio comparativo de la rugosidad de la superficie microbiana. Nuestros resultados concuerdan con estudios anteriores, en los que la eficacia de Er,Cr:YSGG contra *E. faecalis* en conductos radiculares se evaluó mediante el cultivo y enumeración de células viables. Wang *et al.* [109] mostraron que la reducción de *E. faecalis* en conductos radiculares después del tratamiento con Er,Cr:YSGG a 1 W y 2 W de potencia fue del 77 % y del 96 %, respectivamente. A su vez, estos resultados también concuerdan con Yavari *et al.* [199], quienes demostraron que Er,Cr:YSGG a potencia de 2 y 3 W era capaz de reducir el número de bacterias en un 97,6 y 98,47 %, respectivamente. Arnabat *et al.* [196] también determinaron la eficiencia del tratamiento con Er,Cr:YSGG a 2 W de potencia en la eliminación de bacterias en canales radiculares

infectados experimentalmente. De acuerdo con la literatura, el láser de Er,Cr:YSGG a una elevada potencia ha mostrado un importante efecto bactericida frente a *E. faecalis*.

4.2. Estudio de la eficiencia del tratamiento con terapia fotodinámica

Los microorganismos implicados en varias infecciones orales se organizan formando parte de biopelículas, también denominadas biofilm. En el modo de crecimiento en biofilm, los microorganismos están bien adheridos a una superficie y se encuentran envueltos en una matriz polimérica extracelular formada por polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas, agua y restos de células. Esta matriz polimérica confiere protección frente al sistema inmune del huésped y, a menudo, limita la penetración de agentes antimicrobianos [133, 136]. Por lo que, debido a las características y propiedades de los biofilms, los tratamientos convencionales son a menudo ineficaces. La terapia fotodinámica ha surgido como una posible alternativa para reducir el biofilm oral, así como también para contribuir a evitar o por lo menos reducir las tasas de infección persistente. Por este motivo, es de gran interés la realización de experimentos para estudiar la eficacia de la PDT en la eliminación de biopelículas, erradicación de células persistentes y descontaminación de superficies orales. En este estudio, se utilizaron tres aproximaciones diferentes, AFM, CLSM y determinación de la rugosidad de superficie, para estudiar la eficacia de la PDT en la eliminación de biofilms de *E. faecalis* formados sobre la superficie de cubreobjetos de Thermanox™. *E. faecalis* está presente

comúnmente en el sistema de conductos radiculares de los dientes, donde su crecimiento formando biofilm ha sido documentado.

En el campo de la microbiología, la técnica de AFM es una poderosa herramienta que ofrece imágenes de alta resolución y la preparación de muestras de sistemas microbiológicos es muy simple [10]. Además, el AFM ha sido utilizado ampliamente para la visualización de células microbianas individuales y biofilms microbianos, para estudiar propiedades tales como la rugosidad de superficie, para evaluar los efectos morfológicos de tratamientos sobre los microorganismos, y también para obtener información sobre los procesos celulares y las interacciones entre los microorganismos [24, 208, 216–218].

El AFM ofrece la posibilidad de visualizar las superficies microbianas tanto en seco como en líquido sin un pretratamiento complejo de la muestra. A pesar de que es preferible visualizar las muestras biológicas bajo condiciones fisiológicas, algunas estructuras y características morfológicas tales como componentes de la matriz, flagelos o biopelículas, resultan difícil de ser visualizadas en líquido [207, 208, 219, 220]. Una desventaja de la realización de experimentos de AFM en líquido es la resolución insatisfactoria de la imagen debido a la mala adhesión de las células microbianas al sustrato; lo que genera una vibración o ruido durante el rastreo que compromete la calidad de la imagen [206, 221]. Sin embargo, trabajar en soluciones tampón es imprescindible para estudiar las propiedades mecánicas y adhesivas de las células microbianas mediante la técnica de espectroscopía de fuerza [10]. Por otro lado, la obtención de imágenes

de AFM en seco de muestras microbianas también está bien establecida [220, 222], la preparación de la muestra resulta ser más fácil, y este modo de funcionamiento asegura la obtención de imágenes de elevada resolución de las superficies celulares microbianas [223, 224]. En este trabajo, los biofilms tratados y sin tratar fueron secados previamente para realizar las visualizaciones de AFM en aire, ya que este modo de obtención de imágenes es utilizado comúnmente para evaluar los cambios morfológicos en las superficies microbianas causados por varios tratamientos [207, 209, 210, 224–227]. Las imágenes de las biopelículas no tratadas revelaron una morfología normal, así como también unos valores bajos de nanorugosidad, sirviendo de apoyo al hecho de que las alteraciones morfológicas y las lesiones superficiales observadas en biofilms tratados fueron producidas por PDT y no por el método utilizado de preparación de las muestras.

En la figura 4.4 se muestran las imágenes más representativas obtenidas por AFM de biofilms de *E. faecalis* tratados con diferentes fuentes de luz y fotosensibilizadores. Al comparar las imágenes de AFM de topografía en 3D, fue posible observar que la PDT produjo alteraciones y lesiones morfológicas drásticas en las células que forman parte de los biofilms tratados. Por el contrario, en el biofilm sin tratar de *E. faecalis*, las células mantienen, como es de esperar, la forma típica de coco (Fig. 4.4a). En las imágenes correspondientes a los biofilms tratados con los fotosensibilizadores TBO y MB, de forma separada, se puede observar que ninguno de los dos colorantes induce alteraciones morfológicas dignas de mención (Fig. 4.4d, Fig. 4.4e), tan

solo una pequeña proporción de células bacterianas presentan ligeros cambios en la topografía celular, mientras el resto de bacterias que conforman los biofilms muestran una apariencia bastante parecida a las del biofilm sin tratar.

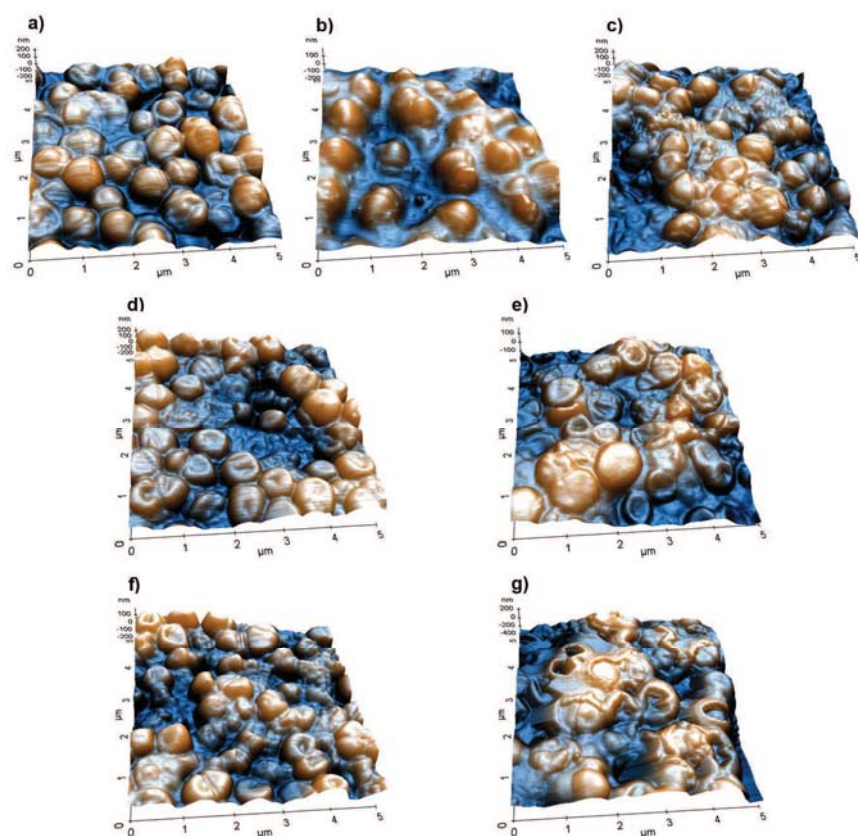


Figura 4.4 Imágenes de AFM de topografía en 3D de biofilm no tratado *E. faecalis* (a), biofilm expuesto a LED durante 30 s (b) biofilm expuesto a láser de diodo durante 30 s (c), biofilm sensibilizado 1 min con TBO (d), biofilm sensibilizado 1 min con MB (e), biofilm sensibilizado 1 min con TBO y expuesto a LED durante 30 s (f), y biofilm sensibilizado 1 min con MB y expuesto a láser de diodo durante 30 s (g). Tamaño de rastreo $25 \mu\text{m}^2$.

Asimismo, también se observan ligeros cambios en la topografía de las biopelículas cuando se utiliza la luz en ausencia de fotosensibilizadores (Fig. 4.4b, 4.4c). Por el contrario, la morfología y la superficie de las células de los biofilms tratados con PDT muestran perturbaciones muy aparentes. En las biopelículas sensibilizadas con azul de toluidina O y expuestas a LED (30 s) (Fig. 4.4f), se pudo observar destrucción de la pared bacteriana, pérdida de la morfología típica celular y fugas del contenido intracelular. Tales alteraciones fueron también observadas en los biofilms sensibilizados con azul de metileno y expuestos al láser de diodo (Fig. 4.4g), aunque en este caso las lesiones fueron mucho más evidentes.

Con el fin de cuantificar los cambios observados en las superficies de biofilms bacterianos tratados y así poder evaluar la eficacia de la PDT, se analizó la rugosidad superficial (R_a), parámetro relevante para caracterizar la morfología de las superficies [212], mediante el software XEI versión 1.8.0 a partir de las imágenes de topografía obtenidas con tamaños de rastreo de $25 \mu\text{m}^2$ y $6,25 \mu\text{m}^2$. Después de la irradiación, es posible que los fotosensibilizadores puedan causar alteraciones en la integridad de la membrana y así facilitar su penetración en la célula causando daños a los componentes citoplasmáticos [228]. Un incremento en la rugosidad de superficie puede sugerir daños celulares tales como distorsión de la morfología celular, destrucción de la pared bacteriana y fuga de contenido intracelular; perturbaciones ya observadas en las imágenes de AFM.

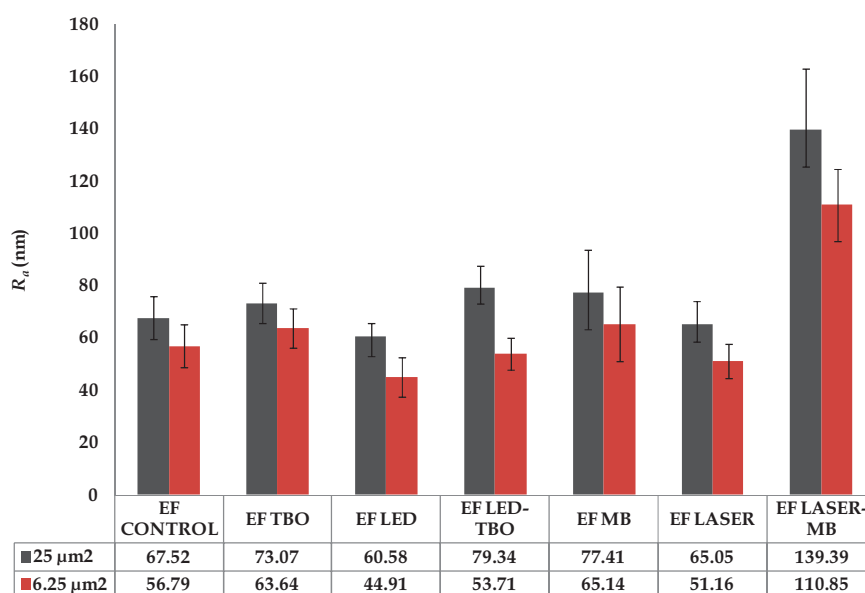


Figura 4.5 Representación gráfica de la rugosidad de superficie (R_a), de acuerdo con los diferentes tratamientos y tamaños de rastreo. Las barras representan los valores del error estándar del promedio. Los valores obtenidos se muestran en la tabla.

Los datos de la rugosidad de superficie representados en la figura 4.5 muestran valores más elevados en las biopelículas tratadas con PDT utilizando conjuntamente azul de metileno y láser de diodo (p -valor < 0.05). Por el contrario, los valores de rugosidad obtenidos después de los tratamientos con luz o fotosensibilizadores solos, fueron similares a los obtenidos en los biofilms de *E. faecalis* no tratados (p -valor > 0.05). Los p -valores obtenidos de las comparaciones por parejas se muestran en la tabla 4.2. Estos resultados sugieren que la combinación de azul de metileno con láser de diodo como tratamiento fotodinámico podría ser eficaz para destruir biopelículas formadas por *E. faecalis*.

6.25 μm^2						
	CONTROL	TBO	MB	LED	LASER	LED+TBO
TBO	0.993	----				
MB	0.999	0.966	----			
LED	0.999	0.965	1.000	----		
LASER	1.000	0.997	0.999	0.999	----	
LED+TBO	0.999	0.999	0.998	0.998	0.999	----
LASER+MB	<i>0.010</i>	<i>0.074</i>	<i>0.019</i>	<i>0.019</i>	<i>0.024</i>	<i>0.056</i>
25 μm^2						
	CONTROL	TBO	MB	LED	LASER	LED+TBO
TBO	0.994	----				
MB	0.999	0.995	----			
LED	1.000	0.998	0.999	----		
LASER	0.999	0.999	0.999	0.999	----	
LED+TBO	0.966	0.999	0.975	0.987	0.999	----
LASER+MB	<i>0.005</i>	<i>0.037</i>	<i>0.017</i>	<i>0.021</i>	<i>0.026</i>	<i>0.099</i>

Tabla 4.2. Múltiples comparaciones de los datos de rugosidad de superficie (R_a) obtenidos tras cada tratamiento, según el tamaño de rastreo de las imágenes de AFM (6.25 μm^2 y 25 μm^2). Los p-valores estadísticamente significativos se indican en *cursiva*.

Las imágenes de CLSM de los biofilms después de los tratamientos PDT, así como los datos de vida y muerte bacteriana obtenidos para cada tratamiento ensayado, confirmaron los resultados de AFM. Por CLSM fue posible diferenciar entre las bacterias con membranas intactas (color verde) y con las membranas dañadas (color rojo y también color naranja) [229]. Las imágenes de CLSM más representativas de los biofilms no tratados y tratados con PDT se

muestran en la figura 4.6. Observando el conjunto de imágenes donde se combinan bacterias vivas y muertas, la mayoría de las bacterias que forman parte del biofilm sin tratar estaban teñidas de verde, indicando una elevada viabilidad bacteriana (Fig. 4.6a). Por otro lado, la presencia de bacterias teñidas de rojo fue mayor en las biopelículas tratadas con LED más TBO (Fig. 4.6b) y con láser más MB (Fig. 4.6c), lo que indica un aumento en el número de bacterias muertas.

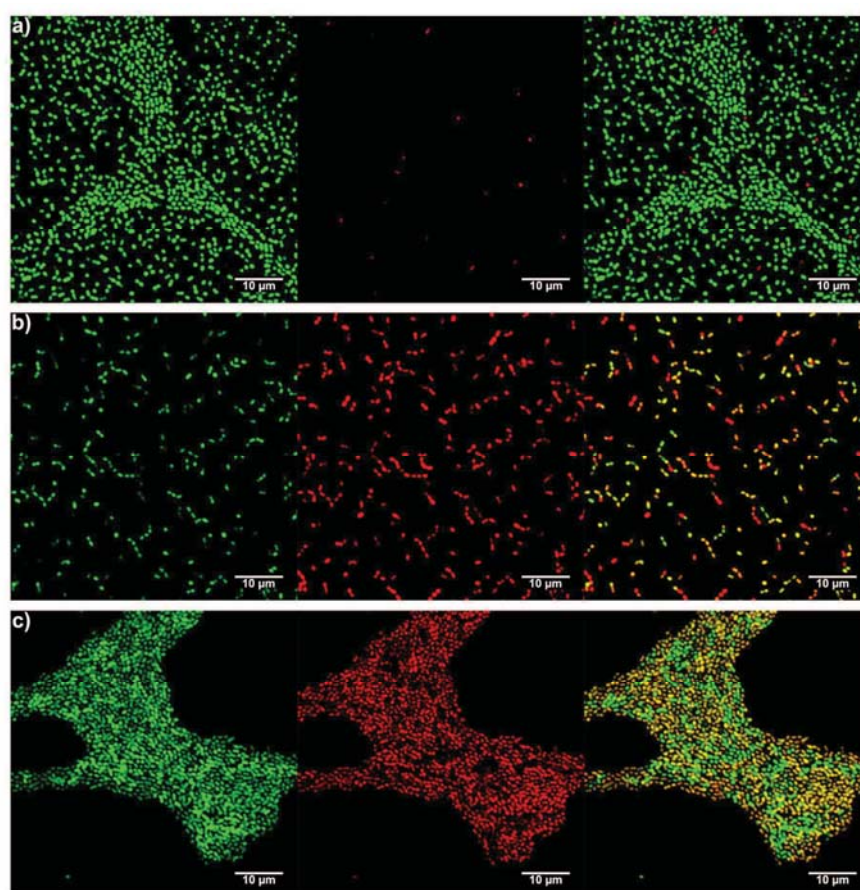


Figura 4.6 Imágenes de CLSM de biofilm no tratado de *E. faecalis* (a), biofilm tratado con LED y TBO (b), y biofilm tratado con MB y láser (c). Columna izquierda: bacterias viables (verde); columna central: bacterias muertas (rojo); columna derecha: bacterias vivas y muertas. Barra de escala 10 µm.

Los porcentajes de bacterias vivas y muertas para cada tratamiento están resumidos en la figura 4.7. Los datos obtenidos confirmaron un alto porcentaje de bacterias muertas en las biopelículas de *E. faecalis* tratadas con las dos combinaciones de PDT. En el caso de los biofilms tratados con LED en ausencia de fotosensibilizador, aproximadamente el 25% de las bacterias estaban dañadas, presentando fluorescencia roja. Por otro lado, en el tratamiento con láser en la ausencia del fotosensibilizador, y en los biofilms tratados con cada uno de los fotosensibilizadores por separado, los resultados fueron similares a los obtenidos en los biofilms no tratados.

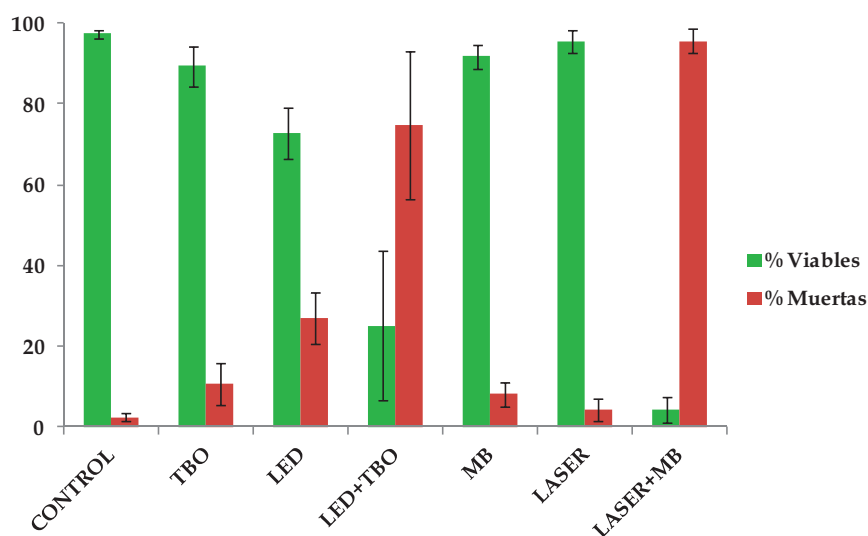


Figura 4.7 Representación gráfica de los porcentajes obtenidos de bacterias vivas y muertas, de acuerdo con los diferentes tratamientos ensayados. Las barras indican el error estándar del promedio.

El análisis estadístico de los porcentajes mediante el método *post hoc* de Tukey (tabla 4.3) confirmó diferencias significativas entre ambos

tratamientos de PDT con el resto de tratamientos ensayados (p -valor < 0.05), resultados que concuerdan con las imágenes ópticas de CLSM.

	CONTROL	TBO	MB	LED	LASER	LED+TBO
TBO	0.802	----				
MB	0.916	0.999	----			
LED	0.068	0.534	0.385	----		
LASER	0.999	0.864	0.953	0.086	----	
LED+TBO	<i>0.000</i>	<i>0.002</i>	<i>0.001</i>	<i>0.048</i>	<i>0.000</i>	----
LASER+MB	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.010</i>	<i>0.000</i>	0.973

Tabla 4.3. Múltiples comparaciones de los porcentajes de bacterias vivas y muertas obtenidos tras cada tratamiento. Los p -valores estadísticamente significativos se indican en *cursiva*.

Varios investigadores han obtenido resultados similares a los nuestros utilizando otras técnicas para visualizar daños inducidos por PDT en las superficies microbianas. Sahu *et al.* [210], utilizaron AFM para visualizar alteraciones topográficas producidas por TBO mediante tratamiento fotodinámico en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En este estudio pudieron observar perturbaciones a nivel de la pared bacteriana, formación de burbujas que sugieren daños en componentes de la membrana, y un incremento en la rugosidad de la superficie celular. Cheng *et al.* [230] evaluaron el efecto bactericida de varias radiaciones con láser y terapia fotodinámica en conductos radiculares infectados experimentalmente con *E. faecalis*. Mediante SEM examinaron la morfología de las células bacterianas antes y después del tratamiento, y observaron que las células bacterianas que permanecieron tras el tratamiento con PDT habían disminuido su

tamaño adoptando un aspecto áspero y fracturado. Melo *et al.* [231] examinaron mediante AFM los cambios producidos por PDT en la forma y tamaño de *Streptococcus mutans*. Observaron que con terapia fotodinámica utilizando conjuntamente TBO y LED se disminuía el diámetro de las células de *S. mutans*.

Nuestros resultados demuestran el enfoque práctico de la técnica de AFM para examinar alteraciones sustanciales en la superficie celular de las biopelículas de *E. faecalis*, inducidas después del tratamiento mediante el uso conjunto de fotosensibilizadores y fuentes de luz. Además, las graves perturbaciones en biofilms de *E. faecalis* producidas por PDT indican que podría ser utilizada para erradicar las biopelículas bacterianas. Sin embargo, son necesarias más investigaciones que incluyan técnicas de medición complementarias para explorar el efecto de la PDT en la integridad de las biopelículas microbianas, formadas por otras especies o comunidades microbianas complejas.

4.3. Caracterización de la superficie celular de *C. albicans* y mutantes CFEM

Las cepas de *C. albicans* utilizadas en este estudio presentaban mutaciones por simple, doble o triple delección en genes que codifican para proteínas unidas a la superficie y que contienen un dominio denominado CFEM. Las proteínas CFEM podrían actuar como receptores de superficie celular, como transductores de señales, o como moléculas de adhesión en las interacciones huésped-patógeno

[189]. Con el fin de estudiar si la ausencia de la expresión de proteínas CFEM, no solo puede afectar a la formación y estructura del biofilm, sino también a la morfología de las células levaduriformes, fue conveniente caracterizar la superficie celular de cada una de las cepas de *C. albicans* utilizadas. Pérez *et al.* [232], visualizaron mediante AFM las superficies celulares de cada cepa, aportando imágenes de alta resolución en las que se pudo observar que las cepas mutantes CFEM presentaban una superficie celular mucho más irregular que la cepa control. En este trabajo, hemos caracterizado la morfología y la rugosidad de las superficies celulares mediante el análisis de la rugosidad de superficie (R_a), a partir de las imágenes de topografía obtenidas por AFM en aire.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, la visualización por AFM en aire de muestras biológicas permite la observación y el estudio de características y estructuras que pueden quedar poco definidas cuando se realizan visualizaciones en medio líquido. A pesar de que es preferible realizar experimentos de AFM con microorganismos bajo condiciones fisiológicas, o en su estado nativo de hidratación, la visualización en medio líquido presenta ciertas limitaciones. Por un lado, la dificultad por mantener bien inmovilizadas las células microbianas en el sustrato puede llegar a comprometer la resolución de la imagen; y por otro lado, las visualizaciones en aire permiten la observación de algunos detalles morfológicos que pasan desapercibidos en medio líquido [233]. Varias investigaciones han demostrado que ni la superficie ni la morfología

de las células microbianas sufren cambios apreciables debido al secado [234–236].

La figura 4.8 muestra las imágenes de AFM de topografía y amplitud más representativas de la cepa control CAI4-URA3, el mutante simple CAN1, el mutante doble KC100 y el mutante triple KC171. En estas imágenes se puede observar una ligera alteración en la morfología de las cepas mutantes CAN1 (Fig. 4.8b), KC100 (Fig. 4.8c) y KC171 (Fig. 4.8d) con respecto a la cepa control (Fig.4.8a).

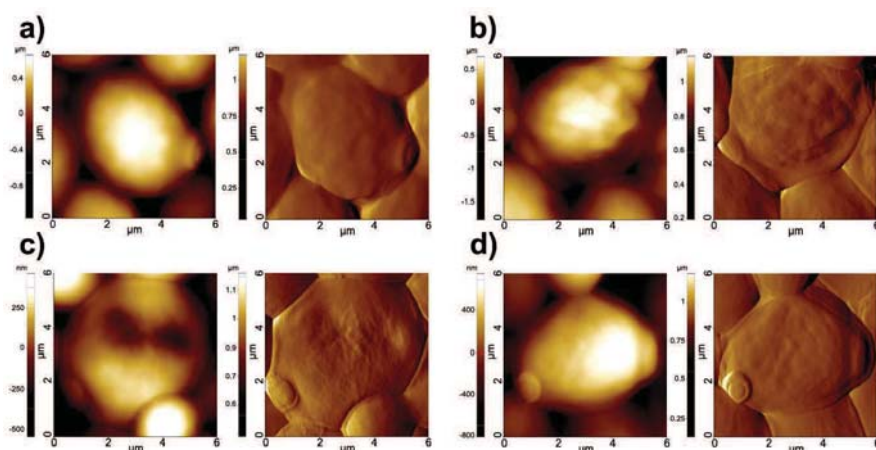


Figura 4.8 Imágenes AFM de topografía y amplitud obtenidas de *C. albicans* CAI4 (a), CAN1 (b), KC100 (c) y KC171 (d).

A partir de las imágenes de topografía se realizó un análisis de la rugosidad de superficie (R_a) de cada cepa en el estado levaduriforme en un área central de $4 \mu\text{m}^2$, los promedios de rugosidad están representados en la figura 4.9. Para analizar los datos obtenidos se compararon las cepas por parejas utilizando el método estadístico de Mann-Whitney U (tabla 4.4).

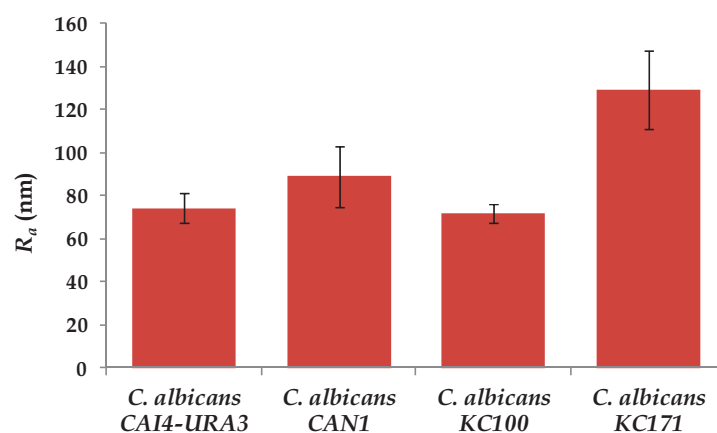


Figura 4.9 Representación gráfica de la rugosidad de superficie (R_a) de las cepas estudiadas de *C. albicans*. Las barras representan los valores del error estándar del promedio.

	CAI4-URA3	CAN1	KC100
CAI4-URA3	-----		
CAN1	0.123	-----	
KC100	0.912	0.075	-----
KC171	<i>0.001</i>	0.043	<i>0.000</i>

Tabla 4.4 Múltiples comparaciones de los datos de rugosidad de superficie de las células levaduriformes ($4 \mu\text{m}^2$). Los p-valores estadísticamente significativos se indican en *cursiva*. Corrección de Bonferroni (p-valor = 0.008)

La caracterización de la superficie y el análisis de la rugosidad determinaron que la cepa mutante KC171 difiere significativamente tanto de la cepa control CAI4 como de la cepa mutante KC100 (p-valor < 0.008). Por el contrario, las comparaciones entre las demás cepas no dieron diferencias significativas, como se puede observar en la tabla 4.4. Estos resultados pueden sugerir que el aspecto, la morfología y la

rugosidad de superficie de la cepa mutante KC171 podrían verse afectados por la ausencia de expresión de proteínas CFEM.

4.4 Estudio de la formación y estructura del biofilm formado por *C. albicans*

Con el fin de poder estudiar la morfología del biofilm formado por *C. albicans*, así como también poder observar si existen diferencias a nivel de estructura y composición del biofilm entre la cepa control y las cepas mutantes CFEM utilizadas, se visualizaron los biofilms formados en la superficie de frascos de cultivo tras 48 horas de incubación, tanto macroscópicamente como microscópicamente mediante AFM.

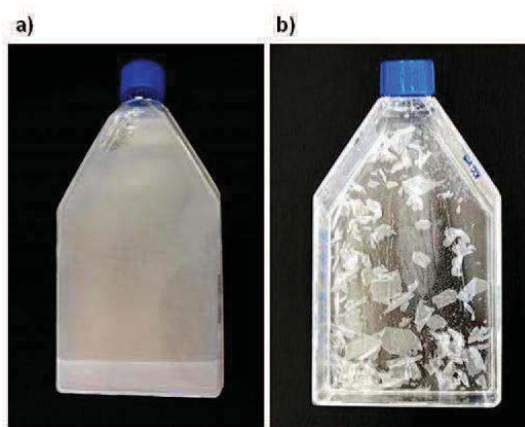


Figura 4.10 Biofilms formados en frascos de cultivo celular por la cepa control CAI4-URA3 (a) y las cepas mutantes CFEM (b).

Como se puede observar en la figura 4.10, la cepa control CAI4-URA3 forma un biofilm compacto, uniforme y perfectamente adherido a la

superficie de los frascos de cultivo. En cambio, tanto la cepa mutante simple, doble, como triple, presentaron un biofilm débil, no adherido a la superficie y por tanto formando pequeñas películas que flotaban en el medio de cultivo.

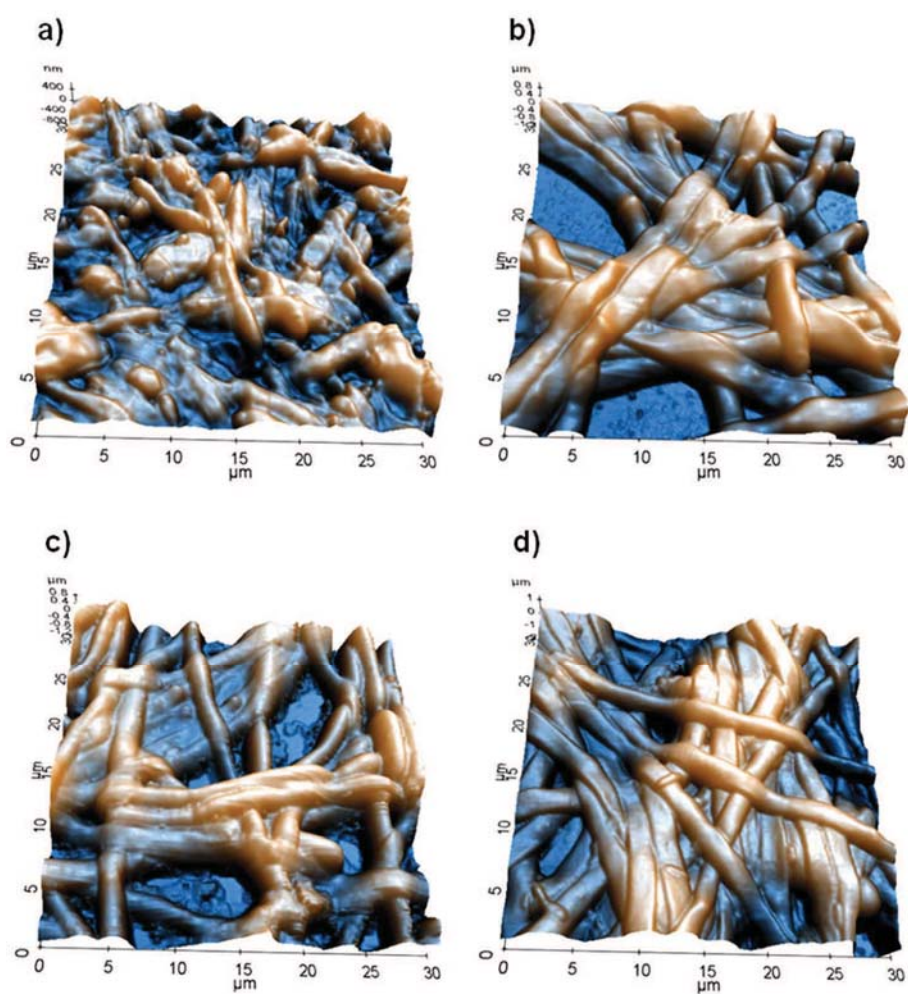


Figura 4.11 Imágenes de topografía en 3D obtenidas mediante AFM del biofilm formado por la cepa control CAI4-URa3 (a), la cepa mutante simple CAN1 (b), doble KC100 (c) y triple mutante KC171 (d). Tamaño de rastreo $900 \mu\text{m}^2$.

Una vez obtenidos los biofilms, con ayuda de *cell scrapers*, pequeñas muestras de cada biofilm se depositaron sobre láminas de mica, sustrato-base ampliamente utilizado para la visualización en AFM. En la figura 4.11 se muestran las imágenes de topografía en 3D obtenidas por AFM. En la composición del biofilm formado por la cepa control CAI4-URA3 aparecen tanto células levaduriformes como formas filamentosas. Mientras que en las imágenes correspondientes a las cepas mutantes CFEM tan solo se puede observar la presencia de formas filamentosas.

En una etapa temprana de la formación del biofilm en *C. albicans*, las células levaduriformes se adhieren al sustrato y empiezan a dividirse, y en la siguiente etapa es donde aparecen las formas filamentosas (hifas y pseudohifas), las cuales están implicadas en el mantenimiento, estabilidad de la estructura y arquitectura del biofilm, representando también nuevos puntos de anclaje para las células levaduriformes, y así permitir el progreso del crecimiento en biofilm [145]. En el caso de las cepas mutantes CFEM, las pequeñas películas que flotan en el medio de cultivo son como agregados de formas filamentosas, se desconoce si realmente están adheridas entre ellas constituyendo así esa estructura de película, o simplemente son hifas que han quedado agregadas entre sí en el momento de su formación. Las proteínas CFEM se ha sugerido que podrían actuar como receptores de superficie celular, transductores de señales, o como moléculas de adhesión implicadas en la interacción huésped-patógeno [189]. Puesto que, como ha sido descrito, las proteínas CFEM podrían estar implicadas en el mantenimiento de la estructura e integridad del

biofilm de *C. albicans* [190], una posible explicación podría ser que la ausencia de expresión de estas proteínas afectara a la adhesión al sustrato por parte de las células levaduriformes, desprendiéndose de la superficie pero manteniéndose unidas entre ellas, y en el momento en que se origina la formación de las hifas quedan entrelazadas, dando lugar a un biofilm desestructurado en pequeñas películas que se mantienen en suspensión.

Es posible que la metodología pudiera mejorarse procediendo a la observación de biofilms que no hubieran tenido que ser trasplantados a la mica.

4.5 Influencia del sustrato en la formación del biofilm en *C. albicans*

Debido a las limitaciones metodológicas, mencionadas en el apartado anterior, se propuso la utilización de otros materiales sobre los que pudiera optimizarse la formación de biofilm y que a su vez, sirvieran de soporte para las visualizaciones en AFM. La metodología empleada en este trabajo de obtención de biofilms formados sobre cubreobjetos de Thermanox™ y piezas dentales, permitió visualizar la estructura intacta del biofilm formado por las distintas cepas de *C. albicans*, y también estudiar si el sustrato influye en la formación, estructura y composición del biofilm.

En las figuras 4.12 y 4.13 están expuestas las imágenes más representativas obtenidas por AFM de los biofilms formados por las cepas de *C. albicans* sobre cubreobjetos de Thermanox™ y el esmalte

de piezas dentales. En ambas figuras, la primera columna corresponde a las imágenes de topografía, o también denominadas de altura, donde se pueden apreciar las diferencias en la topografía de la muestra ya que en oscuro se indican las zonas más profundas y en claro las zonas más elevadas de la topografía. En la segunda columna se muestran las imágenes de amplitud, en las que quedan resaltados los bordes o las pequeñas diferencias que puede haber con respecto al perfil topográfico, dando un aspecto de imagen en relieve. Algunos detalles finos de la topografía de la superficie o estructuras pequeñas, quedan mejor expuestos en este tipo de imágenes de AFM. Y finalmente, la tercera columna corresponde a las imágenes de fase, aportan información sobre las propiedades mecánicas y viscoelásticas de la muestra, permiten diferenciar u observar si en la muestra existen diferentes tipos de materiales o componentes [16].

En estas imágenes podemos observar una composición del biofilm formado por cada cepa similar tanto en Thermanox™ como en esmalte. Las diferencias residen en dos puntos. Por una parte, la cepa mutante doble KC100 genera sobre Thermanox™ biofilms en los que se observa una mayor presencia de células levaduriformes que en el formado sobre esmalte. Por otra parte, si observamos el rango del eje Z (que indica el grosor del área visualizada en concreto) los biofilms formados sobre esmalte presentan un mayor grosor que los formados sobre Thermanox™.

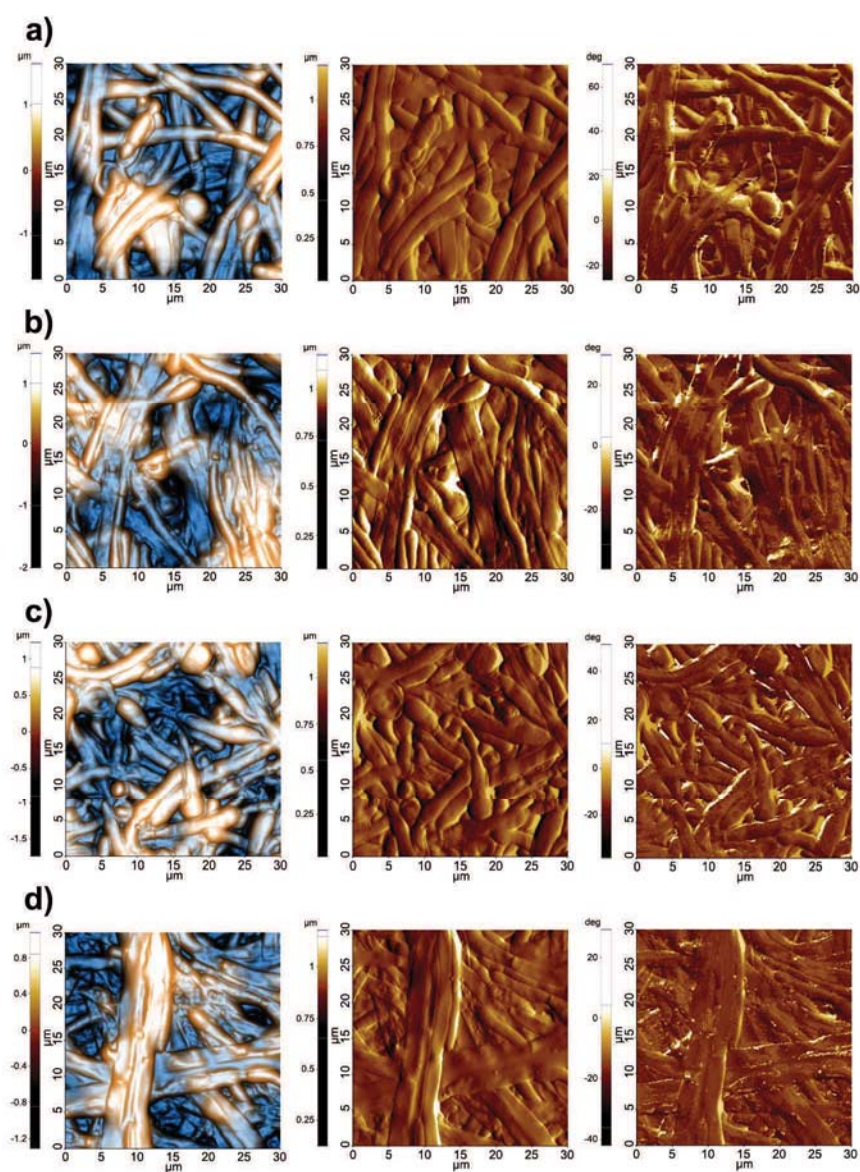


Figura 4.12 Imágenes de topografía, amplitud y de fase obtenidas mediante AFM del biofilm formado sobre ThermanoxTM por la cepa control CAI4-URA3 (a), la cepa mutante simple CAN1 (b), doble KC100 (c) y triple mutante KC171 (d). Tamaño de rastreo 900 μm^2

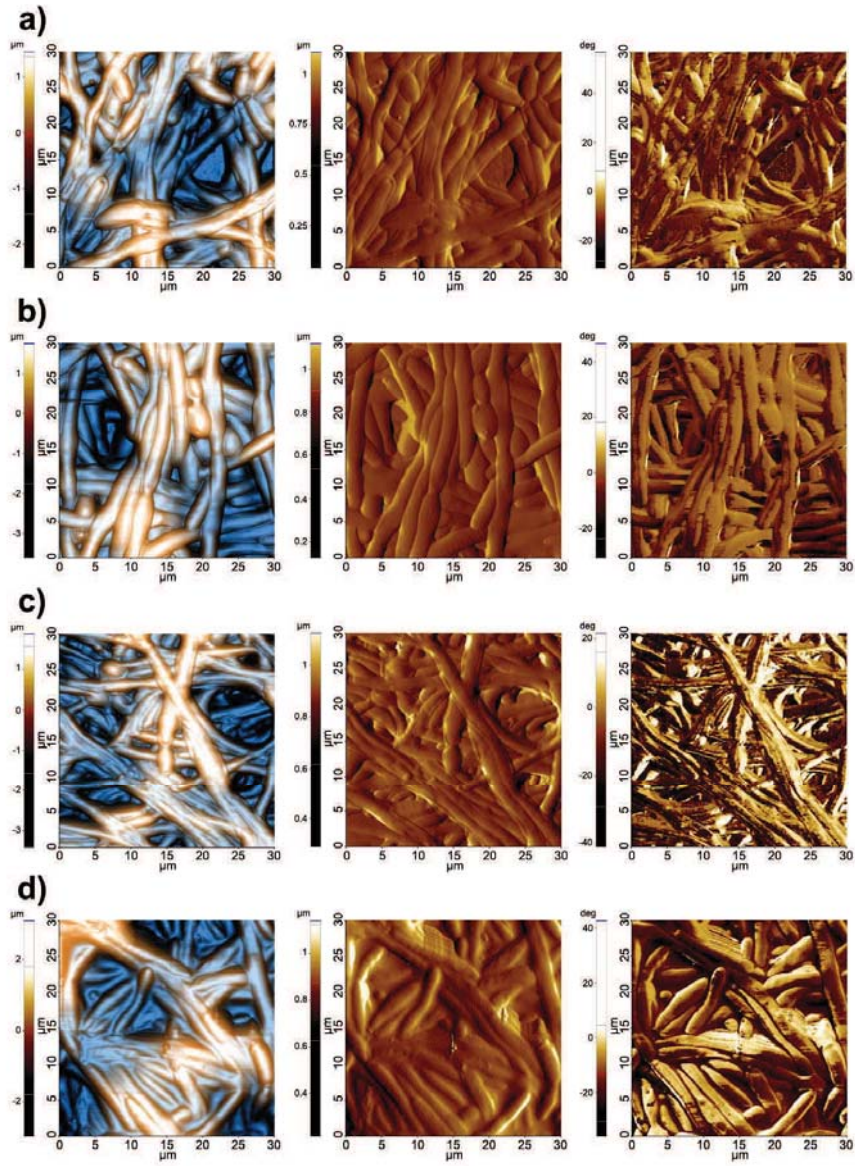


Figura 4.13 Imágenes de topografía, amplitud y de fase obtenidas mediante AFM del biofilm formado sobre esmalte por la cepa control CAI4-URA3 (a), la cepa mutante simple CAN1 (b), doble KC100 (c) y triple mutante KC171 (d). Tamaño de rastreo 900 μm^2

Puede concluirse pues que en este caso la topografía, o la composición, o ambos parámetros de la superficie de un sustrato

juegan un papel determinante en el proceso de adhesión y de formación del biofilm [237, 238].

En este contexto, la rugosidad del sustrato resulta ser un factor clave en la colonización microbiana, puesto que supone más puntos de contacto entre los microorganismos y la superficie, favoreciendo la adhesión y la formación del biofilm [239]. El esmalte presenta una mayor rugosidad que el Thermanox™ (figura 4.14), esta característica ha podido influenciar tanto en la estructura, como en el grosor y composición del biofilm formado en su superficie; como hemos podido observar en las imágenes de AFM.

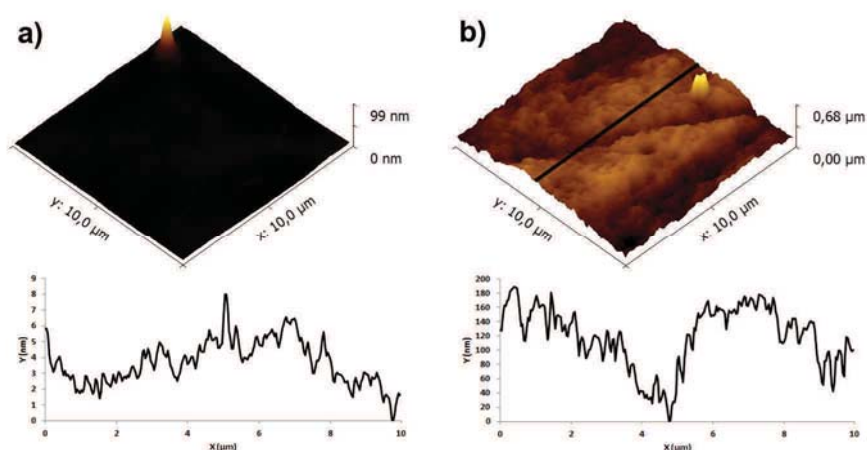


Figura 4.14 Imágenes de topografía en 3D obtenidas mediante AFM de la superficie de Thermanox™ y del esmalte. El perfil topográfico corresponde al perfil de la línea trazada en cada imagen.

Una vez observada la estructura del biofilm formado por cada una de las cepas sobre los diferentes materiales utilizados, se realizó un análisis de la rugosidad de superficie (R_a), con el fin de determinar con

mayor profundidad las diferencias topográficas que puedan existir entre los biofilms formados por las cepas de *C. albicans*. La figura 4.15 muestra una representación gráfica de los promedios de rugosidad de superficie de los biofilms.

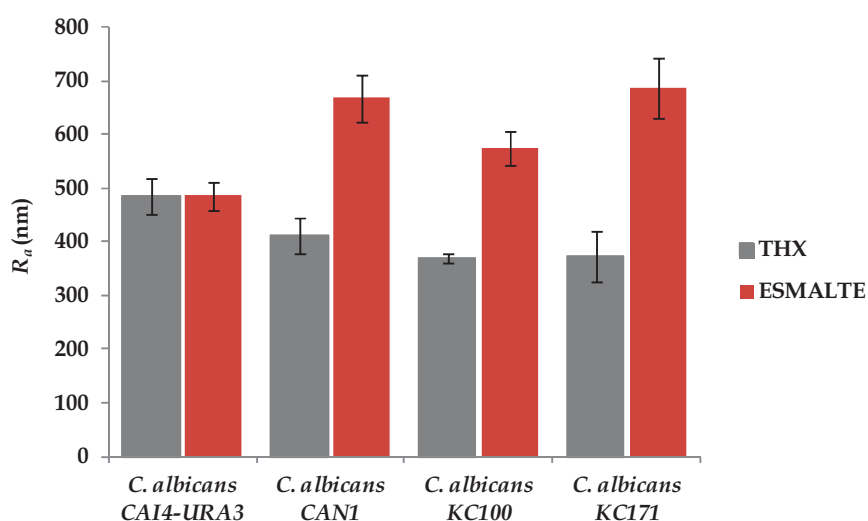


Figura 4.15 Representación gráfica de la rugosidad de superficie (R_a) del biofilm formado por la cepa control y las cepas CFEM sobre Thermanox™ y esmalte. Las barras representan los valores del error estándar del promedio.

Analizando tanto los valores de rugosidad como las imágenes obtenidas de AFM, se puede apreciar que el sustrato o material sobre el que se forma el biofilm puede afectar a su formación, estructura y composición. En este caso, el esmalte presenta una mayor rugosidad que el Thermanox™. Al analizar una superficie tan amplia, podría decirse que los datos obtenidos de rugosidad del biofilm podrían verse influenciados por la propia rugosidad del sustrato, dando una rugosidad superior a la real. Si esto fuera así, el biofilm formado por la cepa control CAI4 debería presentar un valor de nanorugosidad

mucho más elevado en esmalte que en Thermanox™, puesto que la rugosidad del esmalte influiría en los valores de la rugosidad del biofilm, de modo que la rugosidad medida estaría compuesta de la rugosidad de la superficie y la de la biomasa del biofilm. En cambio, los valores de nanorugosidad del biofilm formado por la cepa CAI4-URA3 sobre esmalte y sobre Thermanox™ son muy similares, siendo casi exactos. Este hecho descarta que la rugosidad propia del sustrato se “sume” a la rugosidad del biofilm, y por consiguiente, los valores obtenidos de rugosidad son propios del biofilm formado. Otro aspecto que rechaza la idea que la rugosidad del sustrato se “sume” a la rugosidad del biofilm, es que los datos de rugosidad de los biofilms de las cepas mutantes CFEM formados sobre Thermanox™ son menores a los obtenidos con la cepa control, en cambio, los formados sobre esmalte presentan mayor rugosidad que la cepa control. Si la rugosidad del sustrato “se sumase” a la del biofilm, no observaríamos diferencias entre los dos materiales cuando se trata de las cepas mutantes CFEM.

Ciertas propiedades de la superficie de un sustrato como sus propiedades químicas, la rugosidad o la energía libre superficial, favorecen una mayor adhesión de las células microbianas propiciando la formación del biofilm [240]. En este contexto, los cubreobjetos de Thermanox™ presentan una influencia escasa sobre la formación del biofilm, puesto que se observan diferencias significativas entre los valores de rugosidad de superficie de biofilm formado sobre los dos materiales (p-valor < 0.001). Las cepas mutantes forman un biofilm sobre Thermanox™ de menor grosor y menor rugosidad que el

Resultados y Discusión

formado por la cepa control. En cambio, estas mismas cepas sobre esmalte forman un biofilm más rugoso y más grueso que el biofilm de la cepa control. El resultado de las comparaciones por parejas entre los biofilms de cada cepa levaduriforme formados sobre los dos materiales se muestra en la tabla 4.5.

	CAI4 THX	CAN1 THX	KC100 THX	KC171 THX	CAI4 ESM	CAN1 ESM	KC100 ESM
CAI4 THX	-----						
CAN1 THX	0.808	-----					
KC100 THX	0.337	0.986	-----				
KC171 THX	0.364	0.991	1.000	-----			
CAI4 ESM	1.000	0.787	0.318	0.344	-----		
CAN1 ESM	0.032	0.002	0.000	0.001	0.035	-----	
KC100 ESM	0.625	0.073	0.015	0.017	0.649	0.556	-----
KC171 ESM	0.035	0.003	0.001	0.001	0.038	0.999	0.475

Tabla 4.5 Múltiples comparaciones de los datos de rugosidad de superficie de los biofilms formados por las cepas de *C. albicans* utilizadas sobre Thermanox™ (THX) y esmalte (ESM). Los p-valores estadísticamente significativos se indican en *cursiva*.

Analizando los materiales por separado, los valores de rugosidad de los biofilms producidos por las cepas CFEM y la cepa control no son tan diferentes significativamente cuando se forman sobre Thermanox™ (p-valor > 0.05), a pesar de obtenerse una menor rugosidad en las cepas CFEM. En cambio, sobre hidroxiapatita, los biofilms formados por las cepas mutantes CAN1 y KC171 presentan

valores de rugosidad significativamente diferentes a los de la cepa control (p-valor < 0.05), siendo mucho más elevados. Entre los dos materiales, de nuevo se hacen más evidentes las diferencias de rugosidad entre los biofilms formados por las cepas mutantes CAN1 y KC171 con respecto a las otras dos cepas estudiadas (p-valor < 0.05 y p-valor < 0.001, respectivamente).

Con los resultados obtenidos y de acuerdo con la literatura, se ha podido observar que efectivamente tanto el tipo de sustrato como la rugosidad de su superficie influyen en la formación del biofilm [139, 241]. El biofilm obtenido sobre esmalte por las cepas mutantes CAN1 y KC171 es el que más difiere al formado por la cepa. Y por otro lado, estas mismas cepas presentan diferencias entre sí a nivel de sustrato, formando un biofilm con mucha mayor rugosidad y grosor sobre esmalte. A pesar de que, previamente analizamos que estas cepas mutantes formaban un biofilm débil y poco adherido a la superficie de los frascos de cultivo (Fig. 4.10), se ha comprobado que tanto la composición como la rugosidad de superficie del biofilm difieren significativamente cuando se forma sobre esmalte.

4.6. Fuerzas de adhesión del biofilm de *C. albicans* y mutantes CFEM

C. albicans es un microorganismo capaz de adherirse a cualquier tipo de superficie, ya sean tejidos o biomateriales. La adhesión a una determinada superficie viene mediada por factores no específicos, como serían la rugosidad de superficie, fuerzas electroestáticas, la

hidrofobicidad de la superficie celular y la formación de las hifas; y también por factores específicos como el reconocimiento de ligandos por receptores y adhesinas presentes en las superficies celulares. Además, *C. albicans* es un microorganismo comensal de la cavidad oral, donde se encuentra adherido a superficies continuamente recubiertas de una película de saliva. Esta película puede estar formada por varios componentes de la saliva como proteínas, glicoproteínas o enzimas. Las características fisicoquímicas de la superficie del sustrato determinan el tipo de moléculas que son adsorbidas y que conforman esta película [242-245], la cual confiere unas propiedades químicas a dicha superficie que propician la adhesión microbiana y la formación de biofilm, puesto que aporta ligandos que serán reconocidos por las adhesinas presentes en las células microbianas [139, 171, 240].

En el presente estudio exploratorio se trató de estudiar la adhesión del biofilm a una superficie mediante el uso de la técnica de espectroscopía de fuerza. Debido a la elevada información que se puede obtener a partir del uso de esta técnica, la espectroscopía de fuerza nos permite analizar varios aspectos: examinar si existen diferencias en la adhesión a un sustrato entre los biofilms formados por las cepas utilizadas de *C. albicans*; evaluar si el tipo de sustrato puede favorecer la adhesión de células microbianas, y por consiguiente estar implicado en la formación y estructura del biofilm; así como también nos permite estudiar si la presencia o ausencia de saliva influye en las fuerzas de adhesión. Para todo ello se midieron

las fuerzas de adhesión a dos materiales diferentes, Thermanox™ y hidroxiapatita, con o sin recubrimiento de saliva en sus superficies.

Como resultado de la aplicación de la espectroscopía de fuerza, se obtuvieron curvas de fuerza-distancia en las cuales se registraron los valores más elevados de fuerzas de adhesión tras 0 s y 60 s de tiempo de contacto. Variando el tiempo de contacto entre las células microbianas y los sustratos, se pueden cuantificar las uniones que se producen entre ambas partes y estudiar las propiedades de adhesión [44]. La figura 4.16 muestra un ejemplo de las curvas de fuerza-distancia de cada cepa para cada material utilizado, en ausencia y presencia de una película de saliva, tras 60 s de tiempo de contacto. En la fase de retracción de las curvas (color azul y naranja) es donde se pueden extraer las diferencias entre las cepas, los materiales y el efecto de la saliva. Las curvas de fuerza-distancia obtenidas tras 0 s de tiempo de contacto apenas aportaron información puesto que no se observaron fuerzas de adhesión (datos no representados). En la figura 4.17 se representan gráficamente los promedios de los valores de fuerzas de adhesión obtenidos.

Analizando los valores obtenidos para cada cepa utilizada de *C. albicans*, la cepa mutante CAN1 es la que presenta una adhesión mucho más débil a los dos tipos de materiales utilizados (p-valor < 0.05). Cuando se compara entre los dos tipos de materiales, se observa un ligero aumento en las fuerzas de adhesión obtenidas sobre hidroxiapatita en todas las cepas.

Resultados y Discusión

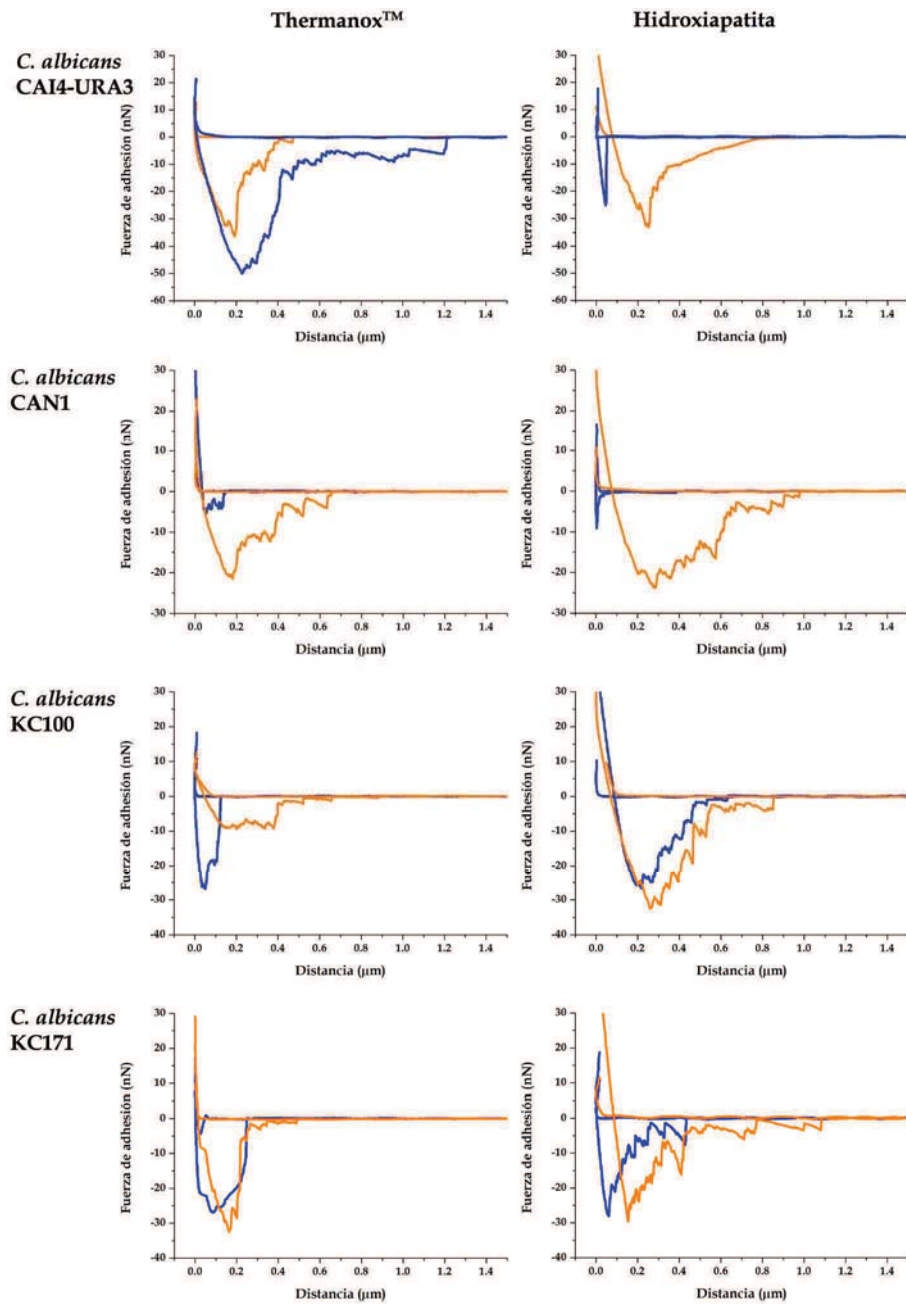


Figura 4.16 Representación de las curvas de fuerza-distancia obtenidas. Azul, ausencia de saliva sobre los materiales. Naranja, presencia de saliva.

En Thermanox™, la cepa control presenta valores de fuerzas de adhesión más elevados que las cepas mutantes. En cambio, sobre hidroxiapatita, la adhesión es mayor en las cepas mutantes KC100 y KC171 que en la cepa control.

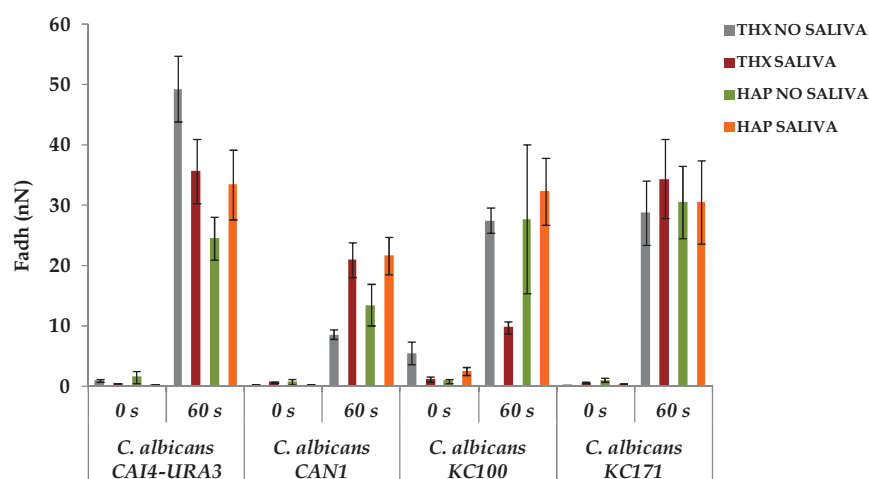


Figura 4.17 Representación gráfica de los promedios de fuerzas de adhesión obtenidos, por cada cepa de *C. albicans*, material y superficie utilizados. Las barras indican el error estándar del promedio. (THX, Thermanox™; HAP, Hidroxiapatita)

Si evaluamos el efecto sobre las fuerzas de adhesión de las cepas mutantes, de la presencia o ausencia de saliva en la superficie de los dos materiales, las cepas CAN1 y KC171 presentan mayor adhesión sobre Thermanox™ recubierto con saliva; contrariamente a lo que sucede con la cepa control y la cepa mutante KC100. En el caso de la hidroxiapatita, la presencia de saliva influye positivamente en las fuerzas de adhesión de todas las cepas, con excepción de la cepa mutante KC171, la cual presenta valores similares en ambos casos.

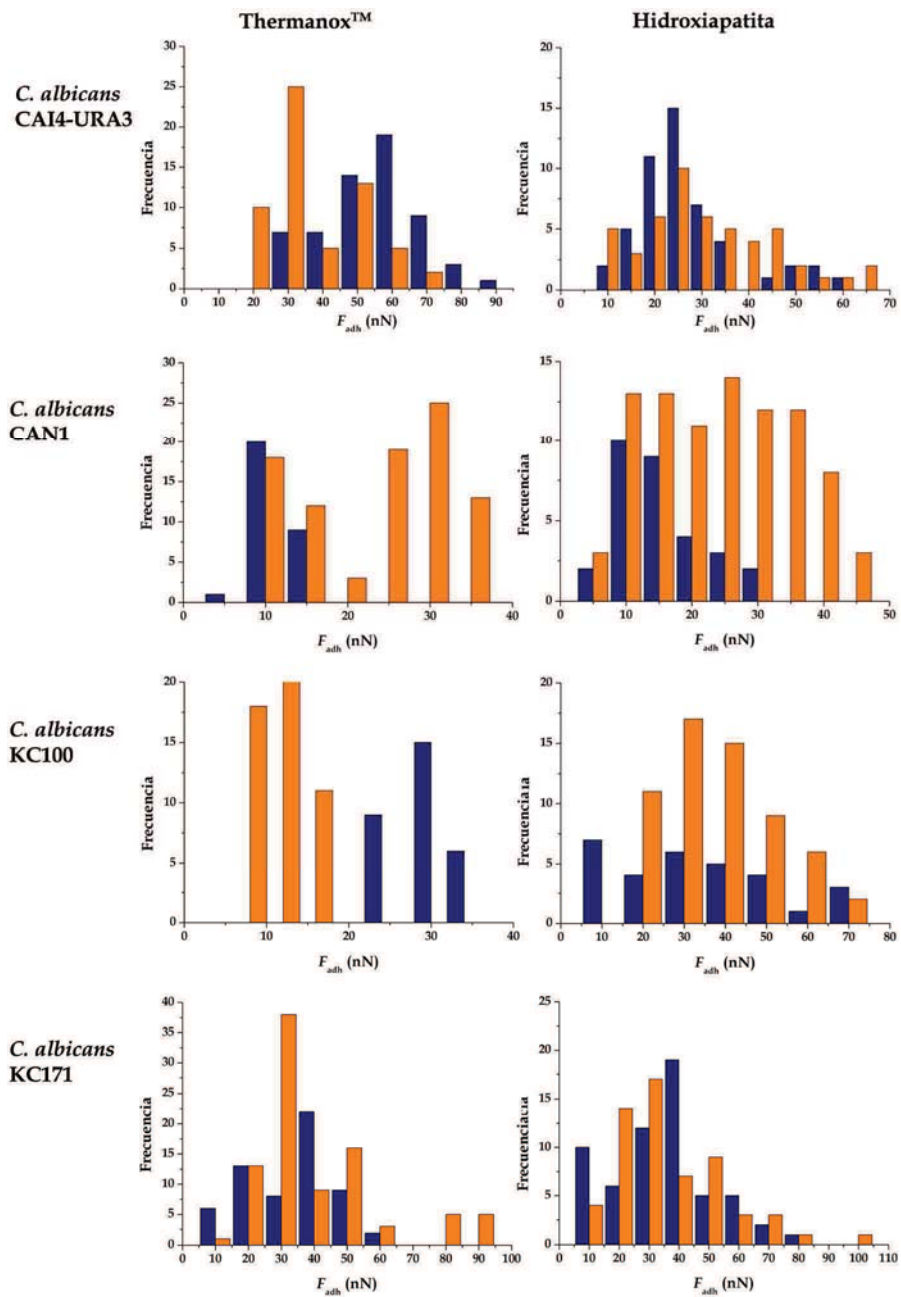


Figura 4.18 Distribución de las fuerzas de adhesión obtenidas por las cepas de *C. albicans* utilizadas sobre los materiales ensayados, con y sin saliva (naranja y azul, respectivamente).

En la figura 4.18 se muestran las distribuciones de las fuerzas de adhesión entre las cepas de *C. albicans* utilizadas y los dos tipos de materiales, en presencia y ausencia de saliva, para 60 s de tiempo de contacto. Se puede observar como el rango de fuerzas de adhesión es superior en hidroxiapatita que en Thermanox™, a excepción de la cepa control, tanto en ausencia como en presencia de saliva sobre la superficie de los materiales utilizados.

Además del efecto de la saliva, también se quiso evaluar si la rugosidad de la superficie de los dos materiales podía tener cierto efecto en la adhesión de las cepas de *C. albicans* utilizadas. La comparación de los valores de rugosidad, obtenidos a partir de la visualización mediante AFM de las superficies de los dos materiales utilizados, en presencia y ausencia de saliva (tabla 4.6), determinó que hidroxiapatita presentaba mayor rugosidad que Thermanox™ (p-valor < 0.0001).

	<i>R_a</i> (nm)	
	Sin saliva	Con saliva
Thermanox™	1.28 ± 0.25	1.45 ± 0.52
Hidroxiapatita	173 ± 22.07	234 ± 52.92

Tabla 4.6 Rugosidad de superficie (*R_a*) de Thermanox™ y hidroxiapatita con y sin recubrimiento de saliva

En la figura 4.19 se muestra un ejemplo de las visualizaciones realizadas con AFM, representadas en 3D, junto con un perfil de la topografía de cada superficie, donde se puede observar la evidente

diferencia entre las superficies de los dos materiales (p -valor < 0.001). No obstante, el parámetro de rugosidad no se vio modificado por la presencia de saliva en ninguno de los dos materiales (p -valor > 0.05), a pesar de que visualmente, la topografía de la superficie de hidroxiapatita se observa claramente diferente antes y después del recubrimiento con saliva.

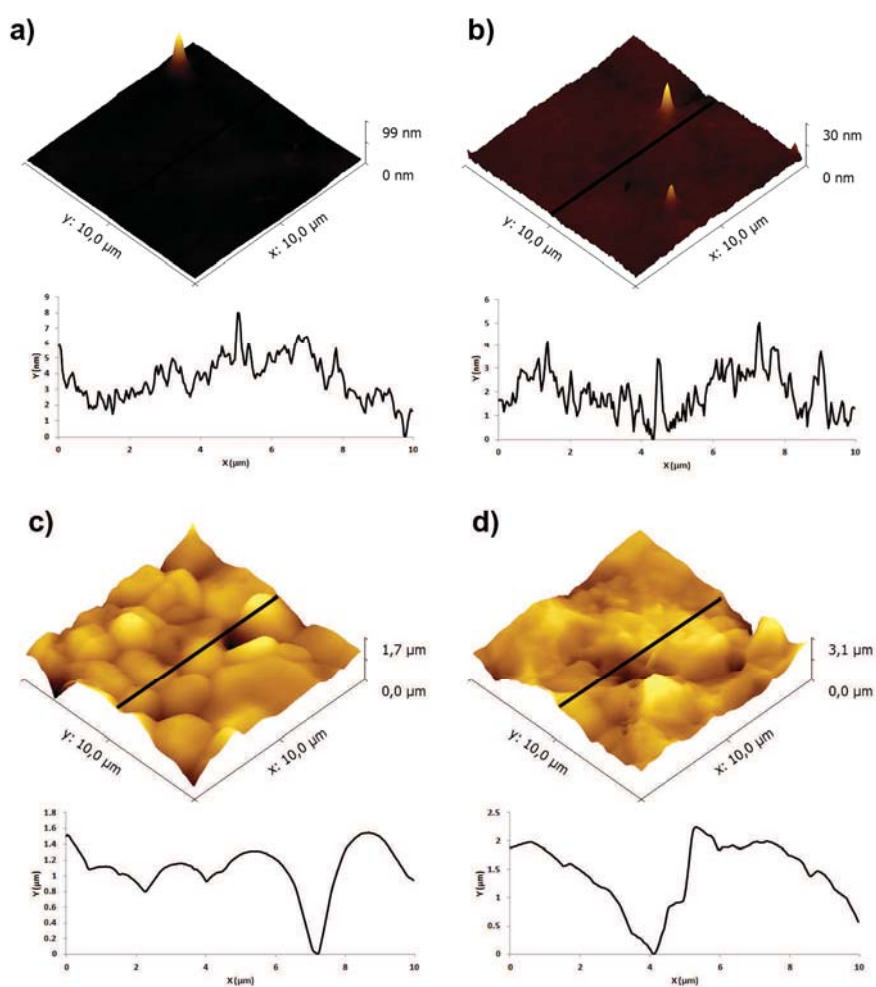


Figura 4.19 Imágenes de topografía en 3D obtenidas mediante AFM de la superficie de Thermanox™ y de hidroxiapatita. El perfil topográfico corresponde al perfil de la línea trazada en cada imagen.

Analizando todos los datos obtenidos de las fuerzas de adhesión de las cepas de *C. albicans* y rugosidad de las superficies de los materiales ensayados, se podría interpretar que tanto la rugosidad como la presencia de saliva sobre el sustrato, provocan un incremento en las fuerzas de adhesión. Por un lado, un sustrato con una superficie rugosa permite mayor número de puntos de contacto con la superficie de las células microbianas, lo que puede fortalecer la adhesión. Por otro lado, el recubrimiento con saliva supone la presencia de una película formada por varias moléculas que suponen nuevos puntos de interacción con receptores y adhesinas presentes en las superficies microbianas, lo que favorece una mayor adhesión a la superficie [171, 240, 246-248].

A pesar de que se ha estudiado que las cepas mutantes CFEM forman un biofilm débil y poco adherido a la superficie, la rugosidad del sustrato y la presencia de saliva pueden tener un efecto positivo en la adhesión de estas cepas a la superficie. Las cepas mutantes KC100 y KC171 muestran valores de fuerzas de adhesión considerablemente similares a los de la cepa control; en cambio, la cepa mutante CAN1 presenta una adhesión mucho menor. Con los resultados obtenidos, se puede asumir que a pesar de que las cepas mutantes de *C. albicans* presentan una falta de expresión de proteínas de la superficie que podrían estar implicadas en la interacción y adhesión al sustrato, la rugosidad del material y la presencia de saliva influyen de manera crucial en la adhesión de estas cepas a la superficie del material.

La formación del biofilm, desde la adhesión inicial de los microorganismos a la superficie, como el desarrollo de su estructura y maduración, pueden verse afectadas por varios factores como son las características de la cepa microbiana, la naturaleza del sustrato, la rugosidad, la hidrofobicidad y la composición de la superficie del sustrato, el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento [142, 144, 147]. Con la aplicación de la espectroscopía de fuerza se ha podido estudiar como una mayor rugosidad de la superficie, y un cambio en su composición debido al recubrimiento de glicoproteínas y otros componentes de la saliva, pueden provocar un incremento en la adhesión de los microorganismos a diferentes sustratos, etapa indispensable para la formación del biofilm microbiano.

5. CONCLUSIONES

1. Las visualizaciones mediante AFM de los cambios topográficos y morfológicos en *E. faecalis* causados por la exposición a la luz láser, así como el análisis cuantitativo de la rugosidad de superficie tras tratamiento, sugieren que el láser de Er,Cr:YSGG a 2 W de potencia es el tratamiento con mayor capacidad de inducir lesiones y daños producidos en las superficies celulares bacterianas de entre los ensayados.
2. Las perturbaciones sustanciales en la superficie y en la morfología celular de las biopelículas de *E. faecalis*, inducidas después del tratamiento conjunto con fotosensibilizadores y fuentes de luz, junto con el análisis cuantitativo de la rugosidad de superficie y la determinación de la mortalidad bacteriana, demuestran que la terapia fotodinámica podría ser utilizada para la eliminación de biofilms bacterianos, la reducción de infecciones persistentes y la desinfección de superficies orales.
3. La cepa de *C. albicans* KC171 con triple delección de los genes que codifican para proteínas CFEM, presenta una rugosidad de superficie mayor que la cepa control CAI4-URA3.
4. Las cepas mutantes CFEM de *C. albicans* forman un biofilm poco adherido a la superficie de los frascos de cultivo, observándose además una mayor presencia de formas filamentosas en su composición.

5. La influencia del sustrato en la formación del biofilm se hace evidente en las visualizaciones realizadas con AFM de biofilms de *C. albicans*, puesto que las cepas mutantes CFEM forman un biofilm sobre esmalte de mayor grosor y rugosidad que sobre Thermanox™.

6. Las curvas de fuerza-distancia obtenidas mediante la aplicación de la técnica de espectroscopía de fuerza celular muestran una menor adhesión de la cepa mutante CAN1 a las superficies, en comparación con la cepa control. Pero en general, la tendencia que se ha observado es que las cepas mutantes CFEM estudiadas presentan mayor adhesión a hidroxiapatita.

7. El análisis de rugosidad de superficie mediante AFM revela que la superficie de hidroxiapatita presenta mayor rugosidad que la superficie de Thermanox™ en ambas condiciones, con y sin recubrimiento de saliva.

8. Los resultados obtenidos podrían indicar que a pesar de que las cepas mutantes de *C. albicans* presentan una falta de expresión de proteínas de la superficie que podrían estar implicadas en la interacción y adhesión al sustrato, la rugosidad del material y la presencia de saliva influyen de manera favorable en la adhesión de estas cepas a la superficie del material.

9. En este trabajo, la aplicación de la microscopía de fuerza atómica ha permitido visualizar superficies celulares de microorganismos implicados en infecciones orales que se organizan formando biofilms,

analizar cuantitativamente la rugosidad tanto de superficies microbianas como de materiales, evaluar el efecto antimicrobiano de varios tratamientos de luz láser y terapia fotodinámica, y estudiar las fuerzas de adhesión microbianas ante diversos sustratos.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Gadegaard N. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques. *Biotech Histochem.* 2006; 81: 87-97
2. Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscopy. *Helv Phys Acta.* 1982; 55: 726-735
3. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett.* 1986; 56: 930-933
4. Ubbink J, Schar-Zammaretti P. Probing bacterial interactions: integrated approaches combining atomic force microscopy, electron microscopy and biophysical techniques. *Micron.* 2005; 36: 293-320
5. Morris VJ, Kirby AR, Gunning AP. *Atomic Force Microscopy for Biologists.* 2nd ed. London: Imperial College Press; 2010
6. Meyer G, Amer NM. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl Phys Lett.* 1988; 53: 1045-1047
7. Alexander S, Hellemans L, Marti O, Schneir J, Elings V, Hansma PK, *et al.* An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *J Appl Phys.* 1989; 65: 164-167
8. Binnig G, Smith DPE. Single-tube three-dimensional scanner for scanning tunneling microscopy. *Rev Sci Instrum.* 1986; 57: 1688
9. Cleveland JP, Manne S, Bocek D, Hansma PK. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev Sci Instrum.* 1993; 64: 403
10. Dorobantu LS, Goss GG, Burrell RE. Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron.* 2012; 43: 1312-1322
11. Grafstrom S, Ackermann J, Hagen T, Neumann R, Probst O. Analysis of lateral force effects on the topography in scanning force microscopy. *J Vac Sci Technol B Microelectron Nanom Struct.* 1994; 12: 1559-1564
12. Gibson CT, Watson GS, Myhra S. Lateral force microscopy—a quantitative approach. *Wear.* 1997; 213: 72-79
13. Ricci D, Braga PC. Imaging methods in atomic force microscopy. In: Braga PC, Ricci D (eds) *Atomic Force Microscopy. Biomedical Methods in Applications.* Humana Press; 2004.
14. Dorobantu LS, Bhattacharjee S, Foght JM, Gray MR. Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir.* 2008; 24: 4944-4951
15. Vie V, Giocondi MC, Lesniewska E, Finot E, Goudonnet JP, Le Grimellec C. Tapping-mode atomic force microscopy on intact cells: optimal adjustment of tapping conditions by using the deflection signal. *Ultramicroscopy.* 2000; 82: 279-288

16. Dorobantu LS, Gray MR. Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning*. 2010; 32: 74-96
17. Liu S, Wang Y. Application of AFM in microbiology: a review. *Scanning*. 2010; 32: 61-73
18. Gaboriaud F, Dufrene YF. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids and surfacesB, Biointerfaces*. 2007; 54: 10-19
19. Watson GS, Watson JA. Quantitative measurements of nano forces using atomic force microscopy (AFM). Quantifying nano forces in three -dimensions using AFM : applications in the biological, physical and chemical sciences. Saarbrücken: VDM Verlag Dr. Müller; 2008
20. Dufrene YF. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol*. 2002; 184: 5205-5213
21. Frisbie CD, Rozsnyai LF, Noy A, Wrighton MS, Lieber CM. Functional group imaging by chemical force microscopy. *Science*. 1994; 265: 2071-2074
22. Hinterdorfer P, Dufrene YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*. 2006; 3: 347-355
23. Muller DJ, Helenius J, Alsteens D, Dufrene YF. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat Chem Biol*. 2009; 5: 383-390
24. Muller DJ, Krieg M, Alsteens D, Dufrene YF. New frontiers in atomic force microscopy: analyzing interactions from single-molecules to cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2009; 20: 4-13
25. Noy A. Chemical force microscopy of chemical and biological interactions. *Surf Interface Anal*. 2006; 38: 1429-1441
26. Dague E, Alsteens D, Latgé J-P, Verbelen C, Raze D, Baulard AR, *et al*. Chemical force microscopy of single live cells. *Nano Lett*. 2007; 7: 3026-3030
27. Müller DJ, Dufrêne YF. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nat Nanotechnol*. 2008; 3: 261-269
28. Dupres V, Alsteens D, Andre G, Verbelen C, Dufrêne YF. Fishing single molecules on live cells. *Nano Today*. 2009; 4: 262-268
29. Horejs C, Ristl R, Tscheliessnig R, Sleytr UB, Pum D. Single-molecule force spectroscopy reveals the individual mechanical unfolding pathways of a surface layer protein. *J Biol Chem*. 2011; 286: 27416-27424
30. Evans EA, Calderwood DA. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*. 2007; 316: 1148-1153
31. Gad M, Itoh A, Ikai A. Mapping cell wall polysaccharides of living microbial cells using atomic force microscopy. *Cell Biol Int*. 1997; 21: 697-706
32. Ganchev DN, Rijkers DTS, Snel MME, Killian JA, de Kruijff B. Strength of integration of transmembrane alpha-helical peptides in lipid bilayers as determined by atomic force spectroscopy. *Biochemistry*. 2004; 43: 14987-14993

33. Lee GU, Kidwell DA, Colton RJ. Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 1994; 2: 354-357
34. Moy VT, Florin EL, Gaub HE. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*. 1994; 266: 257-259
35. Hansma HG, Kasuya K, Oroudjev E. Atomic force microscopy imaging and pulling of nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol*. 2004; 14: 380-385
36. Kedrov A, Janovjak H, Sapra KT, Müller DJ. Deciphering molecular interactions of native membrane proteins by single-molecule force spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2007; 36: 233-260
37. Alsteens D, Dupres V, Klotz S a, Gaur NK, Lipke PN, Dufrêne YF. Unfolding individual als5p adhesion proteins on live cells. *ACS Nano*. 2009; 3: 1677-82
38. Andre G, Kulakauskas S, Chapot-Chartier M-P, Navet B, Deghorain M, Bernard E, *et al*. Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nat Commun*. 2010; 1: 27
39. Dufrêne YF, Evans E, Engel A, Helenius J, Gaub HE, Müller DJ. Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells. *Nat Methods*. 2011; 8: 123-127
40. Sheetz MP. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2: 392-396
41. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6: 622-634
42. Lecuit T, Lenne P-F. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 633-644
43. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006; 124: 715-727
44. Helenius J, Heisenberg C-P, Gaub HE, Muller DJ. Single-cell force spectroscopy. *J Cell Sci*. 2008; 121: 1785-91
45. Kang S, Elimelech M. Bioinspired single bacterial cell force spectroscopy. *Langmuir*. 2009; 25: 9656-9659
46. Ahimou F, Mok L-P, Bardot B, Wesley C. The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signaling. *J Cell Biol*. 2004; 167: 1217-1229
47. Puech PH, Poole K, Knebel D, Muller DJ. A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy*. 2006; 106: 637-644
48. Mei L, Busscher HJ, van der Mei HC, Chen Y, de Vries J, Ren Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. *Eur J Oral Sci*. 2009; 117: 419-426
49. Bowen WR, Lovitt RW, Wright CJ. Atomic Force Microscopy Study of the Adhesion of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Colloid Interface Sci*. 2001; 237: 54-61
50. Dague E, Le DTL, Zanna S, Marcus P, Loubière P, Mercier-Bonin M. Probing in vitro interactions between *Lactococcus lactis* and mucins using AFM. *Langmuir*. 2010; 26: 11010-11017

Bibliografia

51. Liu Y, Strauss J, Camesano TA. Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins. *Biomaterials*. 2008; 29: 4374–4382
52. Lower SK, Hochella MF, Beveridge TJ. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and alpha-FeOOH. *Science*. 2001; 292: 1360–1363
53. Younes JA, van der Mei HC, van den Heuvel E, Busscher HJ, Reid G. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0036917
54. Ovchinnikova ES, Krom BP, Busscher HJ, van der Mei HC. Evaluation of adhesion forces of *Staphylococcus aureus* along the length of *Candida albicans* hyphae. *BMC Microbiol*. 2012; 12: 281
55. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001; 183: 3770–3783
56. Waltimo TM, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997; 30: 96–101
57. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*. 2006; 39: 249–281
58. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008; 34: 1291–1301. e3
59. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija*. 2008; 10: 4–9
60. Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small—understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J*. 2007; 52: S38
61. Baumgartner JC, Bae KS, Xia T, Whitt J, David LL. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *J Endod*. 1999; 25: 324–328
62. Rocas IN, Siqueira Jr JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004; 30: 315–320
63. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001; 34: 429–434
64. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003; 36: 1–11
65. Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod*. 2006; 32: 17–23
66. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992; 7: 257–262

67. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35: 221–228
68. Love RM. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34: 399–405
69. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 121–126
70. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 234–239
71. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987; 66: 1375–1379
72. Tanriverdi F, Esener T, Erganis O, Belli S. An in vitro test model for investigation of disinfection of dentinal tubules infected with *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J.* 1997; 8: 67–72
73. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002; 28: 689–693
74. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod.* 2002; 28: 634–637
75. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J.* 2005; 38: 735–742
76. Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. *Int Endod J.* 1990; 23: 20–27
77. Siqueira Jr JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22: 674–676
78. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod.* 2007; 33: 917–925
79. Rocas IN, Siqueira Jr JF. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod.* 2010; 36: 45–52
80. Siqueira Jr JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34: 1–10
81. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7: 462–478
82. Siqueira Jr JF. Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc.* 2001; 29: 825–837
83. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1975; 1: 238–242

Bibliografia

84. Richman MJ. The use of ultrasonics in root canal therapy and root resection. *J Dent Med.* 1957; 12: 12-18
85. Gutarts R, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo debridement efficacy of ultrasonic irrigation following hand-rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod.* 2005; 31: 166-170
86. Langeland K, Liao K, Pascon EA. Work-saving devices in endodontics: efficacy of sonic and ultrasonic techniques. *J Endod.* 1985; 11: 499-510
87. Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA, Wilson RF. Effectiveness of ultrasonic files in the disruption of root canal bacteria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990; 70: 328-332
88. Cergneux M, Ciucchi B, Dietschi JM, Holz J. The influence of the smear layer on the sealing ability of canal obturation. *Int Endod J.* 1987; 20: 228-232
89. Siqueira Jr JF, Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod.* 2007; 33: 667-672
90. Siqueira Jr JF, Guimaraes-Pinto T, Rocas IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007; 33: 800-805
91. Canalda Sahli C, Brau Aguadé E. Técnicas clínicas y bases científicas, 2a ed. Barcelona: Masson; 2006
92. Siqueira Jr JF, Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: 122-130
93. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006; 39: 484-492
94. Vaghela DJ, Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Jamini N, Ganesh A. Disinfection of dentinal tubules with two different formulations of calcium hydroxide as compared to 2% chlorhexidine: As intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2011; 14: 182-186
95. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, de Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on intratubular *Candida albicans*. *Int J Oral Sci.* 2013; 5: 32-36
96. Teixeira FB, Levin LG, Trope M. Investigation of pH at different dentinal sites after placement of calcium hydroxide dressing by two methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 511-516

97. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod.* 1993; 19: 302-306
98. Mohammadi Z. Laser applications in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2009; 59: 35-46
99. Weichman JA, Johnson FM. Laser use in endodontics. A preliminary investigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971; 31: 416-420
100. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod.* 2002; 28: 679-683
101. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 231-252
102. Bergmans L, Moisiadis P, Teughels W, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J.* 2006; 39: 547-557
103. Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dent Clin North Am.* 2004; 48: 751-770
104. Preethee T, Kandaswamy D, Arathi G, Hannah R. Bactericidal effect of the 908 nm diode laser on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *J Conserv Dent.* 2012; 15: 46-50
105. Rahimi S, Shahi S, Gholizadeh S, Shakouie S, Rikhtegaran S, Soroush Barhaghi MH, et al. Bactericidal effects of Nd:YAG laser irradiation and sodium hypochlorite solution on *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30: 637-641
106. Mowat E, Butcher J, Lang S, Williams C, Ramage G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 1205-12
107. Dos Santos Antonio MP, Moura-Netto C, Camargo SE, Davidowicz H, Marques MM, Maranhao de Moura AA. Bactericidal effects of two parameters of Er:YAG laser intracanal irradiation: ex-vivo study. *Lasers Med Sci.* 2012; 27: 1165-1168
108. Licata ME, Albanese A, Campisi G, Geraci DM, Russo R, Gallina G. Effectiveness of a new method of disinfecting the root canal, using Er, Cr:YSGG laser to kill *Enterococcus faecalis* in an infected tooth model. *Lasers Med Sci.* doi: 10.1007/s10103-013-1410-6
109. Wang QQ, Zhang CF, Yin XZ. Evaluation of the bactericidal effect of Er,Cr:YSGG, and Nd:YAG lasers in experimentally infected root canals. *J Endod.* 2007; 33: 830-832
110. Guidotti R, Merigo E, Fornaini C, Rocca JP, Medioni E, Vescovi P. Er:YAG 2,940-nm laser fiber in endodontic treatment: a help in removing smear layer. *Lasers Med Sci.* doi: 10.1007/s10103-012-1217-x

Bibliografia

111. Raab O. Über die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien . *Zeit Biol.* 1900; 39: 524–546
112. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55: 143–166
113. Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelic N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med.* 2004; 35: 111–116
114. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007; 22: 83–91
115. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38: 468–481
116. Merchat M, Spikes JD, Bertoloni G, Jori G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol Biol.* 1996; 35: 149–157
117. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown ST. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol Biol.* 1996; 32: 159–164
118. Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, Hancock RE. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 2086–2092
119. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994; 264: 382–388
120. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, van Lier J. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990; 59: 149–155
121. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol Biol.* 1992; 14: 262–266
122. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens *ex vivo*. *Int Endod J.* 2008; 41: 227–239
123. Fonseca MB, Junior PO, Pallota RC, Filho HF, Denardin O V, Rapoport A, *et al.* Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26: 209–213
124. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, *et al.* Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010; 36: 292–296
125. Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod.* 2011; 37: 856–859

126. Nunes MR, Mello I, Franco GC, de Medeiros JM, Dos Santos SS, Habitante SM, *et al.* Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29: 803–808
127. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med.* 2003; 33: 311–319
128. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J.* 2006; 201: 101–5
129. Garcez AS, Nunez SC, Hamblim MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod.* 2010; 36: 1463–1466
130. Potera C. Forging a Link Between Biofilms and Disease. *Science.* 1999; 283: 1837–1839
131. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 1387–92
132. Kuhn DM, Ghannoum MA. Candida biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr Opin Investig Drugs.* 2004; 5: 186–97
133. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167–193
134. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 277–81
135. Kaplan J. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 2010; 89: 205–18
136. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318–22
137. Hogan D, Kolter R. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science (80-).* 2002; 296: 2229–2232
138. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* 2011; 19: 557–63
139. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6: 979–86
140. Lim C, Rosli R, Seow H, Chong P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31: 21–31
141. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 309–17
142. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183: 5385–94

Bibliografía

143. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001; 18: 163-70
144. Ramage G, Saville S. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005; 4: 633-638
145. Richard ML, Nobile CJ, Bruno VM, Mitchell AP. *Candida albicans* biofilm-defective mutants. Eukaryot Cell. 2005; 4: 1493-502
146. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. 2006; 55: 999-1008
147. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. Crit Rev Microbiology. 2009; 35: 340-355
148. Hawser S, Douglas L. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun. 1994; 62: 915-921
149. Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol. 1999; 48: 671-9
150. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal Resistance of *Candidal* Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro. J Dent Res. 2001; 80: 903-908
151. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2004; 98: 53-59
152. Ramage G, López-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Methods Mol Med. 2005; 118: 71-9
153. Ning Y, Hu X, Ling J, Du Y, Liu J, Liu H, et al. *Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions. Int Endod J. 2013; 46: 62-70
154. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. Arch Oral Biol. 2007; 52: 761-7
155. Hawser SP, Baillie GS, Douglas LJ. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol. 1998; 47: 253-6
156. Nikawa H, Nishimura H. The role of saliva and serum in *Candida albicans* biofilm formation on denture acrylic surfaces. Microb Ecol Health Dis. 1996; 9: 35-48
157. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. Eur J Oral Sci. 2003; 111: 465-471
158. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. J Dent. 2012; 40: 686-692
159. Frade JP, Arthington-Skaggs BA. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. Mycoses. 2011; 54: e154-e162

160. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. Arch Oral Biol. 2004; 49: 789-98
161. Hawser S, Douglas L. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39:2128-31
162. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 2475-2479
163. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. Nat Protoc. 2008; 3: 1909-24
164. Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Curr Opin Microbiol. 2006; 9: 340-5
165. Schinabeck MK, Long LA, Hossain MA, Chandra J, Mukherjee PK, Mohamed S, et al. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 1727-32
166. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. Infect Immun. 2004; 72: 6023-6031
167. Lazzell AL, Chaturvedi AK, Pierce CG, Prasad D, Uppuluri P, Lopez-Ribot JL. Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis. J Antimicrob Chemother. 2009; 64: 567-70
168. Ricicová M, Kucharíková S, Tournu H, Hendrix J, Bujdáková H, Van Eldere J, et al. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. Microbiology. 2010; 156: 909-19
169. Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. Arch Oral Biol. 2009; 54: 1052-60
170. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. Drug Resist Updat. 2004; 7: 301-9
171. Chaffin W. *Candida albicans* cell wall proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 2008; 72: 495-544
172. Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. Microbiology. 2004; 150: 267-75
173. Klotz SA, Gaur NK, De Armond R, Sheppard D, Khardori N, Edwards JE, et al. *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. Med Mycol. 2007; 45: 363-70
174. Nailis H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during in vitro *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. Mycopathologia. 2009; 167: 9-17

Bibliografía

175. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004; 12: 317–24
176. Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. Mycoses. 2009; 52: 1–10
177. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 2982–92
178. Cao Y-Y, Cao Y-B, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, et al. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 584–9
179. Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 5048–5052
180. Alem MAS, Oteef MDY, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. Eukaryot Cell. 2006; 5: 1770–1779
181. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. TRENDS Microbiol. 2003; 11: 30–36
182. Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 1900–5
183. Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J Antimicrob Chemother. 2000; 46: 397–403
184. Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 2454–63
185. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2002; 49: 973–80
186. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect Immun. 2003; 71: 4333–40
187. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9: 327–335
188. Hube B. Infection-associated genes of *Candida albicans*. Future Microbiol. 2006; 1: 209–218
189. Kulkarni RD, Kelkar HS, Dean RA. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. Trends Biochem Sci. 2003; 28: 118–121
190. Pérez A, Pedrós B, Murgui A, Casanova M, López-Ribot JL, Martínez JP. Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. FEMS Yeast Res. 2006; 6: 1074–84

191. Braun BR, Head WS, Wang MX, Johnson AD. Identification and Characterization of TUP1 -Regulated Genes in *Candida albicans*. *Genetics*. 2000; 156: 31-44
192. Weissman Z, Kornitzer D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Mol Microbiol*. 2004; 53: 1209-1220
193. Burnham NA, Chen X, Hodges CS, Matei GA, Thoreson EJ, Roberts CJ, Davies MC, Tendler SJB. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology*. 2003; 14: 1-6
194. Arnabat J, Escribano C, Fenosa A, Vinuesa T, Gay-Escoda C, Berini L, *et al*. Bactericidal activity of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser in root canals. *Lasers Med Sci*. 2010; 25: 805-810
195. Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg*. 2000; 18: 57-60
196. Kubinek R, Zapletalova Z, Vujtek M, Novotny R, Kolarova H, Chmelickova H, *et al*. Sealing of open dentinal tubules by laser irradiation: AFM and SEM observations of dentine surfaces. *J Mol Recognit*. 2007; 20: 476-482
197. Bago I, Plecko V, Gabric Panduric D, Schauerl Z, Baraba A, Anic I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J*. 2013; 46: 339-347
198. Ting CC, Fukuda M, Watanabe T, Aoki T, Sanaoka A, Noguchi T. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation on the root surface: morphologic analysis and efficiency of calculus removal. *J Periodontol*. 2007; 78: 2156-2164
199. Yavari HR, Rahimi S, Shahi S, Lotfi M, Barhaghi MH, Fatemi A, *et al*. Effect of Er, Cr: YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28 Suppl 1: S91-6
200. Lee BS, Lin YW, Chia JS, Hsieh TT, Chen MH, Lin CP, *et al*. Bactericidal effects of diode laser on *Streptococcus mutans* after irradiation through different thickness of dentin. *Lasers Surg Med*. 2006; 38: 62-69
201. Ebihara A, Majaron B, Liaw LH, Krasieva TB, Wilder-Smith P. Er:YAG laser modification of root canal dentine: influence of pulse duration, repetitive irradiation and water spray. *Lasers Med Sci*. 2002; 17: 198-207
202. Yamada MK, Watari F. Imaging and non-contact profile analysis of Nd:YAG laser-irradiated teeth by scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. *Dent Mater J*. 2003; 22: 556-568
203. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14: 13-29
204. Lin S, Pan D, Lin Q, Yin S, Chen D, Liu Q, *et al*. Evaluation of phase, microstructure and composition of human dentine after Er,Cr:YSGG laser irradiation. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011; 11: 2421-2426

205. Rodriguez-Vilchis LE, Contreras-Bulnes R, Olea-Mejia OF, Sanchez-Flores I, Centeno-Pedraza C. Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29: 493–500
206. Bolshakova A V, Kiselyova OI, Filonov AS, Frolova OY, Lyubchenko YL, Yaminsky I V. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy.* 2001; 86: 121–8
207. Silva Junior A, Teschke O. Dynamics of the Antimicrobial Peptide PGLa Action on *Escherichia coli* Monitored by Atomic Force Microscopy. *World J Microbiol Biotechnol.* 2005; 21: 1103–1110
208. Gillis A, Dupres V, Delestrait G, Mahillon J, Dufrêne YF. Nanoscale imaging of *Bacillus thuringiensis* flagella using atomic force microscopy. *Nanoscale.* 2012; 4: 1585–91
209. Canetta E, Walker GM, Adya AK. Nanoscopic Morphological Changes in Yeast Cell Surfaces Caused by Oxidative Stress: An Atomic Force Microscopic Study. *J Microbiol Biotechnol.* 2009; 19: 547–555
210. Sahu K, Bansal H, Mukherjee C, Sharma M, Gupta P. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol Biol.* 2009; 96: 9–16
211. Dubrovin EV, Voloshin AG, Kraevsky SV, Ignatyuk TE, Abramchuk SS, Yaminsky IV, *et al.* Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria. *Langmuir.* 2008; 24: 13068–13074
212. Botta SB, Ana PA, de Sa Teixeira F, da Silveira Salvadori MC, Matos AB. Relationship between surface topography and energy density distribution of Er,Cr:YSGG beam on irradiated dentin: an atomic force microscopy study. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29: 261–269
213. Gordon W, Atabakhsh VA, Meza F, Doms A, Nissan R, RizoIU I, *et al.* The antimicrobial efficacy of the erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser with radial emitting tips on root canal dentin walls infected with *Enterococcus faecalis*. *J Am Dent Assoc.* 2007; 138: 992–1002
214. De Souza EB, Cai S, Simionato MR, Lage-Marques JL. High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106: e68–72
215. Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J Clin Laser Med Surg.* 2004; 22: 9–13
216. Díaz C, Schilardi PL, Salvarezza RC, Fernández Lorenzo de Mele M. Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011; 82: 536–42
217. Andre G, Deghorain M, Bron PA, van Swam II, Kleerebezem M, Hols P, *et al.* Fluorescence and atomic force microscopy imaging of wall teichoic acids in *Lactobacillus plantarum*. *ACS Chem Biol.* 2011; 6: 366–376

218. Francius G, Domenech O, Mingeot-Leclercq MP, Dufrêne YF. Direct observation of *Staphylococcus aureus* cell wall digestion by lysostaphin. *J Bacteriol.* 2008; 190: 7904–9
219. Bolshakova A V, Kiselyova OI, Yaminsky I V. Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy. *Biotechnol Prog.* 2004; 20: 1615–22
220. Núñez ME, Martin MO, Chan PH, Duong LK, Sindhurakar AR, Spain EM. Atomic Force Microscopy of Bacterial Communities. *Methods Enzymol.* 2005; 397: 256–268
221. Robichon D, Girard JC, Cenatiempo Y, Cavellier JF. Atomic force microscopy imaging of dried or living bacteria. *C R Acad Sci III.* 1999; 322: 687–93
222. Núñez ME, Martin MO, Chan PH, Spain EM. Predation, death, and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005; 42: 263–71
223. Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Römling U, Belova LM, *et al.* Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol.* 2007; 7: 70
224. Rossetto G, Bergese P, Colombi P, Depero LE, Giuliani A, Nicoletto SF, *et al.* Atomic force microscopy evaluation of the effects of a novel antimicrobial multimeric peptide on *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanomedicine.* 2007; 3: 198–207
225. Liu S, Ng AK, Xu R, Wei J, Tan CM, Yang Y, *et al.* Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale.* 2010; 2: 2744–50
226. Fernandes JC, Eaton P, Gomes AM, Pintado ME, Xavier Malcata F. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy.* 2009; 109: 854–60
227. Deupree SM, Schoenfisch MH. Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on Gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomater.* 2009; 5: 1405–1415
228. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A Study of the Uptake of Toluidine Blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the Mechanism of Lethal Photosensitization. *Photochem Photobiol.* 1998; 68: 370–376
229. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods.* 1999; 37: 77–86
230. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, *et al.* Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med.* 2012; 44: 824–831
231. De Melo MA, Rolim JP, Zanin IC, Barros EB, Da-Costa EF, Rodrigues LK. Characterization of Antimicrobial Photodynamic Therapy-Treated *Streptococci*

- Mutans*: An Atomic Force Microscopy Study. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31: 105-109
232. Pérez A, Ramage G, Blanes R, Murgui A, Casanova M, Martínez JP. Some biological features of *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins containing the CFEM domain. 2011; 1-12
233. Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR, Pelletier DA, Wu S, Allison DP. AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy.* 2003; 97: 209-216
234. Pelling AE, Li Y, Shi W, Gimzewski JK. Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 6484-9
235. Méndez-Vilas A, Díaz J, Donoso MG, Gallardo-Moreno AM, González-Martín ML. Ultrastructural and physico-chemical heterogeneities of yeast surfaces revealed by mapping lateral-friction and normal-adhesion forces using an atomic force microscope. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2006; 89: 495-509
236. Adya AK, Canetta E, Walker GM. Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6: 120-128
237. Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazon M, Liley M, Ploux L. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater.* 2010; 6: 3824-46
238. Hilbert LR, Bagge-Ravn D, Kold J, Gram L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2003; 52: 175-185
239. Mei L, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Ren Y. Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. *Dent Mater.* 2011; 27: 770-778
240. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, *et al.* Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *ACTA Biomater.* 2009; 1-7
241. Giraldez M, Resua C, Lira M, Oliveira M, Magarifios B, Toranzo A, *et al.* Contact Lens Hydrophobicity and Roughness Effects on Bacterial Adhesion. *Optom Vis Sci.* 2010; 87: e426-e431
242. Absolom DR, Lamberti FV, Policova Z, Zingg W, van Oss CJ, Neumann AW. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 1983; 46: 90-7
243. Rykke M, Sönju T. Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. *Eur J Oral Sci.* 1991; 99: 463-469
244. Sotres J, Pettersson T, Lindh L, Arnebrant T. Nanowear of salivary films vs. substratum wettability. *J Dent Res.* 2012; 91: 973-978
245. Hannig C, Hannig M. The oral cavity – a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig.* 2009; 13: 123-139

246. Teughels W, Assche N Van, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 68-81
247. Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS, Levine MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect Immun.* 1993; 61: 2644-52
248. Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. *Arch Oral Biol.* 1992; 37: 613-622

7. PUBLICACIONES

Olivia Pons-Vicente
Lidia López-Jiménez
M^a Angels Sánchez-Garcés
Sergi Sala-Pérez
Cosme Gay-Escoda

A comparative study between two different suture materials in oral implantology

Authors' affiliations:

Olivia Pons-Vicente, M^a Angels Sánchez-Garcés, Sergi Sala-Pérez, Cosme Gay-Escoda, Department of Oral Surgery and Orofacial Implantology, School of Dentistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain
Lidia López-Jiménez, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Schools of Medicine and Dentistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Corresponding author:

Prof. Dr Cosme Gay-Escoda
Centro Médico Teknon
Instituto de Investigación
IDIBELL
C/Vilana no. 12
08022 Barcelona
Spain
Tel.: +34 93 402 4274
Fax: +34 93 393 3070
e-mail: cgay@ub.edu

Key words: bacterial adherence, bacterial plaque, contamination, multi-filament, silk, suture material

Abstract

Objective: The prospective study compares, in split-mouth design, the use of two different suture materials, silk vs. Teflon-coated, multi-filament braided polyester threads suture.

Material and methods: Ten edentulous or partially edentulous patients were surgically treated for implant installation. Each side was sutured with either, randomly selected one or the other suture material. Seven days postsurgically, the sutures were removed and three knots per patient and side were collected for microbiological testing. Additionally, a piece of each suture thread was analysed before clinical use to test its susceptibility for bacterial adherence. To evaluate the patient's subjective opinion, a questionnaire based on Visual Analogue Scale had to be filled out by all included patients 1 week after the intervention.

Results: The results showed a more pronounced plaque accumulation for silk sutures but there was not a statistical difference. The intraoperative handling of the silk sutures was less comfortable and the patient comfort was worse than Teflon-coated polyester suture.

Conclusion: The bacterial adherence on Teflon-coated polyester suture was slightly inferior than silk suture although it did not show the expected differences.

Sutures are frequently used in Oral Surgery and Oral Implantology (Yu & Cavaliere 1983; Gay-Escoda et al. 2004; Parirokh et al. 2004). Sutures serve to maintain tissue approximation until the wound attains sufficient tensional strength to prevent dehiscence. Correct closure and stabilization of surgical wound margins influence the success of the surgical procedure (Selvig et al. 1998; McCaul et al. 2000; Parirokh et al. 2004; Otten et al. 2005; Leknes et al. 2005b). Moreover, a study that assessed the influence of flap tension on the tearing characteristics of mucosal tissue in relation to various sutures showed that tissue trauma may be reduced by choosing finer suture diameters (6-0, 7-0) (Burkhardt et al. 2008).

Recent interest has focused on the research of different properties of suture types (natural and synthetic) such as physical, chemical and biological properties together with tissue reaction and plaque accumulation (Selvig et al. 1998; Parirokh et al. 2004; Otten et al. 2005; Leknes et al. 2005b). Bacterial adherence to surgical sutures might serve as an infection focus causing a delay in wound healing (Blomstedt et al. 1977; Osterberg & Blomstedt 1979; Yaltirik et al. 2003; Parirokh et al. 2004; Otten et al. 2005; Leknes et al. 2005b). Several authors (Chu & Williams 1984; Selvig et al. 1998; Otten et al. 2005; Leknes et al. 2005a, 2005b) have suggested that the risk of infection depends on the degree of bacterial adherence and the phy-

Date:

Accepted 11 May 2010

To cite this article:

Pons-Vicente O, López-Jiménez L, Sánchez-Garcés M^a, Sala-Pérez S, Gay-Escoda C.
A comparative study between two different suture materials in oral implantology.
Clin. Oral Impl. Res. 22, 2011; 282–288.
doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01993.x

sical and chemical configuration of suture materials. Furthermore, multi-filament sutures have a higher risk of potentiating infection than monofilament sutures, as multi-filament sutures may promote bacterial adherence to other sterile areas by capillary action, thereby enhancing the infection process (Lilly et al. 1968; Stillman et al. 1980; Aderriotis & Sandor 1999; Merrit et al. 1999; Leknes et al. 2005a, 2005b; Banche et al. 2007).

On the other hand, multi-filament sutures elicit a greater inflammatory response than monofilament sutures, as they contribute to bacterial adhesion within the interstices of the suture (Lilly et al. 1968; Parirokh et al. 2004; Leknes et al. 2005b; Banche et al. 2007). In addition, further publications (Gristina & Costerton 1985; Aderriotis & Sandor 1999; Costerton et al. 1999; Donlan & Costerton 2002; Senpuku et al. 2003) described the evidence of bacterial biofilm formation on sutures that consists of a polymeric extracellular matrix synthesized by microorganisms. These microorganisms grow on the biofilm, showing a great resistance to antimicrobial therapy.

Surgical silk is a non-absorbable, multi-filament suture of organic origin widely used for different procedures in Oral Surgery and Oral Implantology with a notable ease of handling and low cost. Unfortunately, the braided nature of the silk suture promotes bacterial accumulation, resulting in a more intense and prolonged inflammatory response in gingival mucosa than synthetic materials (Wallace et al. 1970; Tomita et al. 1993; Selvig et al. 1998; Gay-Escoda et al. 2004). An inflammation of the tissues adjacent to the wound increases the risk of infection and serves as a good reservoir for pathogen microorganisms (Laroche et al. 1995; Selvig et al. 1998; Merrit et al. 1999; Bajaj et al. 2004; Parirokh et al. 2004; Otten et al. 2005; Leknes et al. 2005a, 2005b). Synthetic multi-filament sutures such as Teflon-coated polyester (Tevdek[®], Deknatel, Mansfield, OH, USA) grant easy handling, reduce capillarity and tissue reaction and perform similar to monofilament sutures (Deknatel 2007).

No study has been published so far concerning the comparison of contamination and bacterial adherence with silk vs. Teflon-coated, multi-filament braided polyester threads in Oral Surgery. Thus, the objectives to be considered in the present study

are: to compare the degree of plaque accumulation with two types of non-resorbable sutures (silk and Teflon-coated polyester), to identify the type and number of bacteria strains isolated from sutures at 7 days after insertion and to examine the qualitative and/or quantitative differences between the two sutures. Furthermore, technical benefits of suture materials and patient comfort were also evaluated. The null hypothesis is that bacterial plaque adhesion is similar with either Teflon-coated polyester suture or silk suture.

Material and methods

A prospective experimental study with a 'split-mouth' design was conducted in a sample of 10 total or partial edentulous patients during the placement of dental implants at the Oral Surgery and Implantology Department of the University of Barcelona. Inclusion criteria for the study were: healthy patients (ASA classification 1 or 2) of both genders, with total or partial edentulism, with no periodontal disease and good oral hygiene (<20% of plaque accumulation according to the O'Leary index), requiring implant rehabilitation at least in two different dental quadrants. Exclusion criteria included: patients with systemic diseases (ASA III or higher) that contraindicate surgery, patients with diabetes, requiring immune suppression or corticosteroids, patients with nutritional and/or neurological alterations, patients with previous antibiotic therapy (washout period of 6 months) and patients reporting serious postoperative complications (immediate and late infections, wound disruption, etc.).

Study design

The suture material used was black braided silk 3/0 C-16/CR 26 mm, 1/2 circle (Aragó[®], Aragón, Barcelona, Spain) and Teflon-coated polyester (polytetrafluoroethylene [PTFE]) 3/0 gauge C-17 (Tevdek[®], Deknatel) with a pyramid-tipped trocar needle with a cutting square base. The 10 included patients, either with total or partial edentulism, underwent surgical procedures for the placing of dental implants. Information was given previously to all participants and signed informed consent forms were obtained. Surgical procedures were performed under local anaesthesia with Articaine 4% with epinephrine 1:100,000, following the

usual technique: a mucoperiosteal envelope flap was raised, dental bed preparation was started using a round drill under irrigation with distilled water and finally implants were placed according to the conventional protocol. Then, buccal flaps were sutured using simple interrupted stitches in contralateral jaw quadrants. However, different suture materials were used for each quadrant in order to intraindividually compare bacteria colonization. The suture material used was chosen at random.

In addition, a piece of thread measuring 1.5 cm for each type of suture was analysed before suturing to determine if an increase in susceptibility to bacterial adherence is connected with the suture material. All sutures were placed and removed by the same skilled operator to eliminate interexaminer variability. During the sample-taking process, those knots adjacent to a neighbouring tooth were excluded from the study as they are associated with an increase of bacterial plaque accumulation. A minimum of three knots per patient were tested for each type of suture. The collected samples were immediately transported in sterile tubes to the Laboratory of Microbiology in Campus de Bellvitge (University of Barcelona). All participants were given instructions on standard principles of correct oral hygiene, which began at 24 h after surgical procedure and consisted of dental brushing with a surgical tooth brush 3 times/a day and 0.12% chlorhexidine (CHX) oral rinse, twice daily during 15 days.

Postoperative medication for all patients consisted of:

- Amoxicillin 750 mg: 1/8 h; 7 days (Clamoxyl[®], ClaxoSmithKline, Madrid, Spain).
- Clindamycin 300 mg: 1/6 h; 5 days (Dalacín[®], Pfizer, Madrid, Spain) for subjects allergic to penicillin or penicillin derivatives.
- Diclofenac 50 mg: 1/8 h; 5 days (Voltarén[®], Novartis, Barcelona, Spain).
- Rescue medication: Metamizol magnesium 575 mg (Nolotil[®], Boehringer Ingelheim, Barcelona, Spain) 1/6 h; 5 days.

Follow-up visits were performed at 7 days after insertion. Patients completed a written questionnaire, which assessed the degree of comfort with suture on each side valued by a Visual Analogue Scale (VAS). Because of the very different appearance of

suture materials, it was impossible for the observer to be blind to the suture types.

The clinical parameters recorded by the operator for each suture material were: intraoperative handling of the suture, presence of suppuration in the surgical wound, easiness of suture removal, degree of patient comfort for each type of suture and the degree of pain after removal, all of them measured by VAS. In addition, other parameters were also registered: age, gender, smoking habit, place of sutures and type of edentulism.

Sample processing

Sutures were removed with sterile instruments and then placed in tubes diluted with 1 ml of 1/4 strength Ringer's solution (one tube per suture). Suture fragments were homogenized for 3 × 1 min in an ultrasound bath and shaken vigorously on the vortex mixer. Following vortexing, serial dilutions of 1/4 strength Ringer's solution were then made for each sample. Selective culture media were inoculated to detect microorganisms using a colony formation unit per unit surface area (CFU/surface). Sabouraud dextrose glucose agar plates supplemented with cloranfenicol were used for identification of fungi and yeasts. Tryptone soy agar with 10% sheep blood was prepared to determine total mesophyll aerobes. Mitis-salivarius agar plates were used for the detection of oral streptococci. Finally, agar plates were made for the isolation and enumeration of anaerobic agar. These plates were placed in GasPak jars to produce an anaerobic atmosphere with Anaerogen. Colony counts were performed at 24, 48 and 72 h after incubation for each type of plate. In parallel to this study, an *in vitro* study was conducted using 15 mm of suture that had not been in contact with the buccal cavity. Fragments were immersed in a culture medium composed of tryptone and soya inoculated with *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* for a period of 48 h. Tryptone soy agar was used for *E. faecalis* and *E. coli* identification. Sabouraud dextrose glucose agar plates with cloranfenicol were inoculated with *C. albicans* and tryptone soy agar with 10% sheep blood was prepared to determine *S. mutans*. The plates were

incubated for 24 h and colony counts were performed for each type of plate. Dilution parameters and sample processing parameters for the *in vivo* study were calculated according to the results obtained in the *in vitro* study. Each type of suture was conducted in duplicate and three analyses were performed for bacterial and fungal colonization. The present study lasted 6 weeks and clinical data were obtained from patients following implant surgical procedures in June 2007; the follow-up period finished in July 2007.

Statistical analysis

Microsoft access for Windows was used for data collection. The analysis of bacterial counts was performed on logarithmic transformed data. The Statistical Package for the Social Sciences for Windows (SPSS v15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for the statistical analysis. A paired *t*-test and Wilcoxon's signed-ranked test

were used to evaluate the clinical parameters and colony count differences between both sutures for the *in vitro* and *in vivo* study. Identification of aerobic and anaerobic bacteria, fungi and yeasts, among other experimental groups were also tested. The significance level was set at $P < 0.05$.

Results

The sample consisted of seven females and three males in the age group of 40–70 years. The mean age was 55 years with a standard deviation (SD) of 9.3 and 40% of participants were partial edentulous and the rest (six cases) were edentulous patients. Sixty per cent of suture fragments were placed in the jaw and 40% in the upper maxillae. Seventy per cent of patients reported any smoking habit. Evidence of local infection was not observed in any patient. The degree of patient com-

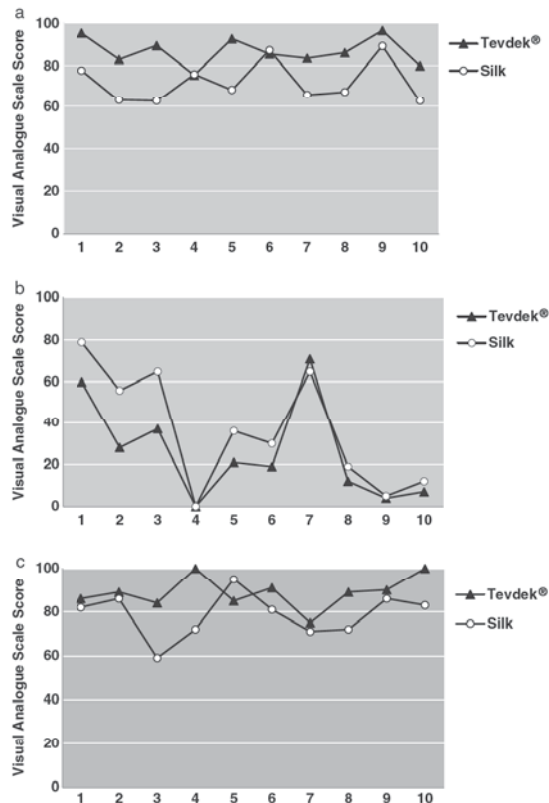


Fig. 1. Visual Analogue Scale results. (a) Degree of patient comfort, (b) pain after removal and (c) ease of intraoperative handling.

fort on the day of the suture removal assessed by VAS was greater for the Teflon-coated polyester suture compared with silk (mean comfort was 86.6 mm with a SD of 6.80 and 71.9 mm with a SD of 9.94 by completing 100 mm VAS, respectively) (Fig. 1a). The statistical *t*-test showed significant differences for the Teflon polyester-coated suture ($P=0.001$). No evidence of wound suppuration was found for any of the sutures under study. All patients except one showed preference for the polyester suture. Pain after removal was greater for silk suture than for polyester suture (VAS mean value of 36.7 mm with a SD of 28.05 and 25.9 mm with a SD of 23.80, respectively) with a significant statistical difference ($P=0.017$) (Fig. 1b). Ease of intraoperative handling was also greater for the Teflon-coated polyester sutures (VAS mean value of 88.9 mm and SD of 7.40 for polyester and 78.7 mm and a SD of 10.24 for silk). Statistical results were significant for the Tevdek® suture with a *P*-value of 0.021 (Fig. 1c).

A total of 60 suture samples (three on each side *per* patient) were obtained under sterility conditions by an independent operator for further microbiological analysis. Mean results in colony counts for the silk suture were slightly higher ($8.07E+02$ CFU/mm and a SD of $2.53E+03$) than Teflon-coated polyester suture ($1.36E+02$ CFU/mm and SD of $3.75E+02$) (Fig. 2) but the statistical results with the non-parametric Wilcoxon's test were not significant ($P=0.483$). Anaerobic microorganisms were more frequent (70% of patients) and no fungi and yeasts were detected in the processed samples. Bacterial mean counts for the *in vitro* study were very similar on each type of suture ($3.98E+05$ CFU/mm and SD of $1.54E+05$ for silk suture and $2.65E+05$ CFU/mm and SD of $1.38E+05$ for Teflon-coated polyester suture) (Fig. 3). The *t*-test for paired samples showed no significant statistical differences ($P=0.097$). With respect to the tested microorganisms *E. coli* and *E. faecalis* showed higher adherence to suture materials; however, *C. albicans* and *S. mutans* biofilms were less efficient (Fig. 4).

Discussion

Non-absorbable and absorbable sutures are frequently used in Oral Surgery and Oral

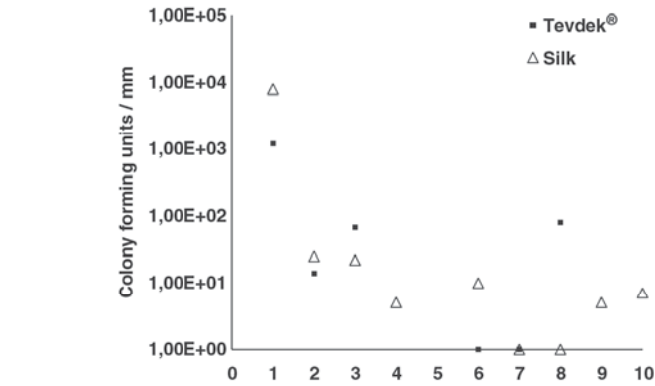


Fig. 2. Individual results of total colony counts for each patient and type of suture.

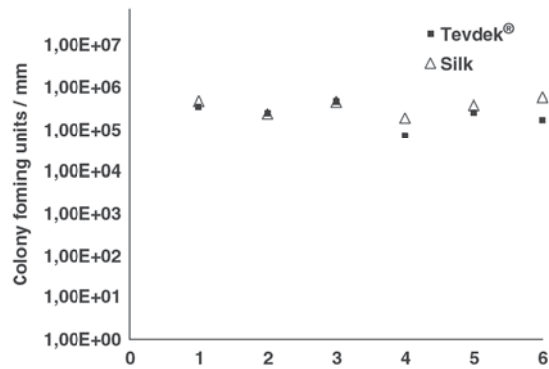


Fig. 3. Mean counts obtained from 15 mm of each suture at 48 h of contact with active growing cultures of the microorganisms included in the *in vitro* study.

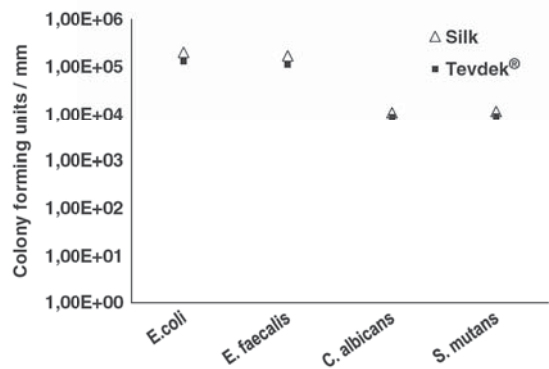


Fig. 4. Mean counts for each one of the tested strains in the *in vitro* study for both sutures.

Implantology. Sutures used in the present study belong to the group of non-absorbable sutures; in particular, silk is a multi-fila-

ment suture of organic origin and polyester is a synthetic absorbable suture. Surgical silk is strong enough to resist breaking during

surgery, it facilitates ease of handling and it is well tolerated by patients. Furthermore, silk has been a favoured suture material in Oral Surgery, used as a comparison standard in assessing the usability and it is the most common suture material used (Racey et al. 1978; Tomita et al. 1993; Banche et al. 2007). However, it has some disadvantages: multi-filament sutures promote bacterial adhesion by capillary action, thereby enhancing the infection process. In addition, foreign body reaction to sutures is commonly found, which decreases tensile strength in a moist environment. Finally, shear effect is observed during suture insertion through delicate tissues (Tomita et al. 1993; Gay-Escoda et al. 2004).

Teflon-coated polyester (Tevdek[®], Deknatel) is a synthetic, non-absorbable multi-filament suture with a coating structure similar to monofilament sutures. Teflon or PTFE is a resistant, flexible polymer and biologically inert that reduces capillarity and tissue reaction (Deknatel 2007). Other excellent physical-chemical properties (tensile strength) refer to an optimal tissue compatibility and low-friction surface. Ease of handling is therefore achieved so as to ensure optimal tissue closure (Parirokh et al. 2004; Deknatel 2007). Tubular Teflon-coated facilitates handling of polyester surgical sutures, thus achieving greater dimensional stability; and according to the results of our study, polyester sutures are associated with higher ductility and notable ease of handling in comparison with silk sutures. In fact, Teflon-coated polyester sutures are smoother, having no elastic memory but flexible enough. The results showed the highest ease of removal by the operator with Teflon-coated polyester, with a mean value of 90.9 mm on the 100 mm VAS scale. Furthermore, PTFE filament have a uniform and compact surface, which improves biocompatibility and proper hygiene (Bajaj et al. 2004; Deknatel 2007). According to our results, the degree of patient comfort on the day of suture removal was greater for the Teflon-coated polyester than for silk sutures. Most patients showed preference for the polyester sutures. Pain after removal was greater for silk than for polyester suture although there were no differences.

Sutures should cause minimal tissue reaction so as to encourage primary wound

healing and induce minimal scar formation (Pinheiro et al. 1997; Parirokh et al. 2004). Earlier research (Wallace et al. 1970; Guiray et al. 1997; Selvig et al. 1998) has confirmed that sutures placed intraorally produce a tissue response that is different from the response observed at other experimental sites (Selvig et al. 1998; McCaul et al. 2000; Parirokh et al. 2004; Leknes et al. 2005b; Banche et al. 2007). In fact, one of the most important aspects of oral tissue response to suture materials is the tendency for microbial attachment and accumulation (McCaul et al. 2000). It has been shown that silk sutures, which are multi-filamentous, consistently produce greater inflammatory reactions than monofilament sutures within the interstices of the suture (Lilly et al. 1968, 1972; Racey et al. 1978; Selvig et al. 1998; Merrit et al. 1999; Leknes et al. 2005a). Furthermore, braided silk sutures appear to conduct bacterial migration and other potentially noxious contaminants to a great extent than monofilament sutures (Lilly et al. 1968; Aderiotis & Sandor 1999; Leknes et al. 2005a; 2005b; Selvig et al. 1998). In this respect, it has been postulated that multi-filament suture materials permitted a 'wicking phenomenon' that could advance oral fluids and bacteria along suture filaments by capillary action (Lilly et al. 1968). Some authors (Parirokh et al. 2004) have corroborated that the wicking effect is evidenced by swelling and exudate among the suture fibres. On the other hand, it has been reported that synthetic suture materials elicit a mild inflammatory tissue response than sutures of organic origin (Selvig et al. 1998). An advantage of non-absorbable suture materials is that they elicit little tissue reaction (Greenwald et al. 1994).

By 3 days, epithelial ingrowth had to some extent occurred along the suture track particularly for the silk sutures and at a biofilm-like structure was present (Leknes et al. 2005b). Biofilms are usually encased in an extracellular polysaccharide matrix (Renton-Harper et al. 1996; Costerton et al. 1999; Donlan & Costerton 2002). As a result, an inflammatory response of surrounding tissues begins, which serves as a reservoir for pathogen microorganisms. However, bacterial plaque formation has yet not been studied in detail. Thus, one of the objectives of this study was to quantitatively determine the bacterial biofilm

formation on two non-absorbable sutures at 7 days after implant surgical procedure. An intraindividual comparison with the two types of suture materials was made in the *in vivo* study, where silk suture associated the highest values of total counts for both anaerobic and aerobic microorganisms, although no statistical significance was achieved. In contrast, some authors have found no statistically significant differences in terms of bacterial adhesion between silk and synthetic sutures were found in either kind of study *in vivo* and *in vitro* (Banche et al. 2007).

Our results infer that the existence of bacterial biofilm and the difference in microbiota on the suture surface is associated with individual factors, such as oral hygiene and the levels of bacterial plaque in each patient (Merrit et al. 1999). Host factors may influence the existence of bacteria accumulation, such as: saliva, plaque fluid, hormonal changes and active systemic disease (Senpuku et al. 2003). In the present study, the bilateral placement of a series sutures is considered as a representative sample. We therefore concluded that there were no statistically quantitative, qualitative or clinical differences in the results. Nevertheless, it is reported that bacterial adhesion is associated with suture material, where synthetic sutures report a higher microbial affinity than silk sutures (Banche et al. 2007). In addition, there are some studies in which the administration of anti-infective therapy may have inhibited bacterial growth (Renton-Harper et al. 1996; Menendez et al. 2005). A study that compared formulas containing CHX showed a higher plaque reduction regarding formulas with Triclosan and cetylpyridinium chloride (Renton-Harper et al. 1996). Others concluded that CHX significantly reduces *S. mutans* levels after 7 days (Menendez et al. 2005). In the present study, all patients were administered broad-spectrum oral antimicrobials and daily topical CHX solutions.

In comparison with the previous results, a study conducted by Leknes et al. (2005b) on bacterial accumulation found no statistically significant differences between the presence and absence of anti-infective therapy (CHX solution and intramuscular administration of a broad-spectrum antibiotic).

It is reported that the effect of CHX mouthwash on bacterial growth on sutures is not present differences in aerobic and anaerobic counts (McCaul et al. 2000).

Recent studies have indicated an increase in suture slack over time and that the lack of tight fit between suture and surrounding tissues allows epithelial invagination and conduction of bacteria into the connective tissue (Stillman et al. 1980; Selvig et al. 1998; Leknes et al. 2005a). It is concluded that silk sutures produce a significantly higher degree of slack than PTFE (Leknes et al. 2005a). In our study, we did not report an increase in suture slack or wound suppuration for either kind of suture.

A bigger sample size would be needed in order to identify the quantitative and/or qualitative differences in biofilm formation on silk and polyester sutures and to evaluate its clinical impact. Future research on the effect of CHX over bacterial

strains adhered to suture material is also needed.

Conclusions

The bacterial adherence results obtained in this study between both types of suture did not show the differences expected. However, clinical parameters assessed (comfort patient, ease of handling and pain after removal) were superior for the polyester Teflon-coated polyester suture. It appears that higher microbiological differences could be related to a bigger sample size.

Acknowledgements The authors also wish to thank Klockners S.A. and Prof. Dr Miquel Viñas-Ciordia from the

University of Barcelona, Faculty of Dentistry, Department of Microbiology, for his contribution in this study. *Conflict of interest and source of funding statement:* The authors declare that they do not have any conflict of interest. The present study was researched and compiled by the Research Group 'Dental and Maxillofacial Pathology and Therapeutics' of the IDIBELL Institute and was financially supported by an educational assistance agreement for Oral Surgery among the University of Barcelona, the Consorci Sanitari Integral and the Servei Català de la Salut – Generalitat de Catalunya (Catalan Health Service).

References

- Aderiotis, D. & Sandor, G.K. (1999) Outcomes of irradiated polyglactin 910 Vicryl Rapide fast-absorbing suture in oral and scalp wounds. *Journal Canadian Dental Association* **65**: 345–347.
- Bajaj, M.S., Sastry, S.S., Ghose, S., Betharia, S.M. & Pushker, N. (2004) Evaluation of polytetrafluoroethylene suture for frontalis suspension as compared to polybutylate-coated braided polyester. *Clinical and Experimental Ophthalmology* **32**: 415–419.
- Banche, G., Roana, J., Mandras, N., Amasio, M., Galesio, C., Allizond, V., Angeretti, A., Tullio, V. & Cuffini, A.M. (2007) Microbial adherence on various intraoral suture materials in patients undergoing dental surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **65**: 1503–1507.
- Blomstedt, B., Osterberg, B. & Bergstrand, A. (1977) Suture material and bacterial transport. An experimental study. *Acta Chirurgica Scandinavica* **143**: 71–73.
- Burkhardt, R., Preiss, A., Joss, A. & Lang, N.P. (2008) Influence of suture tension to the tearing characteristics of the soft tissues: an in vitro experiment. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 314–319.
- Chu, C.C. & Williams, D.F. (1984) Effects of physical configuration and chemical structure of suture materials on bacterial adhesion. A possible link to wound infection. *American Journal of Surgery* **147**: 197–204.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318–1322.
- Deknatel, T. (2007). Tevdek® Braided, non-absorbable suture. Available at <http://www.deknatel.com/products/tevdek-polydek.asp> [accessed 8 June 2007].
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 167–193.
- Gay-Escoda, C., Sánchez-Garcés, M.A. & Berini-Aytés, L. (2004) Instrumental y material quirúrgico. Asepsia y esterilización. In: Gay-Escoda, C. & Berini-Aytés, L., eds. *Tratado de Cirugía Bucal*, 51–53. Madrid: Ergon.
- Greenwald, D., Shumway, S., Albear, P. & Gottlieb, L. (1994) Mechanical comparison of 10 suture materials before and after in vivo incubation. *The Journal of Surgical Research* **56**: 372–377.
- Gristina, A.G. & Costerton, J.W. (1985) Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **67**: 264–273.
- Guiray, C.B., Ataveser, A., Durgun, B. & Araz, K. (1997) Clinical and electron microscope comparison of silk sutures and *n*-butyl-2-cyanocrylate in human mucosa. *Australian Dental Journal* **42**: 255–258.
- Laroche, G., Marios, Y., Guidoin, R., King, M.W., Martin, L., How, T. & Douville, Y. (1995) Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: From polymeric raw material to monofilament vascular suture. *Journal of Biomedical Materials Research* **29**: 1525–1529.
- Leknes, K.N., Roynstrand, I.T. & Selvig, K.A. (2005a) Human gingival tissue reactions to silk and expanded polytetrafluoroethylene sutures. *Journal of Periodontology* **76**: 34–42.
- Leknes, K.N., Selvig, K.A., Boe, O.E. & Wikesjo, U.M. (2005b) Tissue reactions to sutures in the presence and absence of anti-infective therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 130–138.
- Lilly, G.E., Armstrong, J.H., Salem, J.E. & Cutcher, J.L. (1968) Reaction of oral tissues to suture materials. II. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **26**: 592–599.
- Lilly, G.E., Cutcher, J.L., Jones, J.C. & Armstrong, J.H. (1972) Reaction of oral tissues to suture materials. IV. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **33**: 152–157.
- McCaul, L.K., Bagg, J. & Jenkins, W.M. (2000) Rate of loss of irradiated polyglactin 910 (Vicryl Rapide) from the mouth: a prospective study. *The British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **38**: 328–330.
- Menendez, A., Li, F., Michalek, S.M., Kirk, K., Makhija, S.K. & Childers, N.K. (2005) Comparative analysis of the antibacterial effects of combined mouthrinses on *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology* **20**: 31–34.
- Merrit, K., Hitchins, V.M. & Neale, A.R. (1999) Tissue colonization from implantable biomaterials with low numbers of bacteria. *Journal of Biomedical Materials Research* **44**: 261–265.
- Osterberg, B. & Blomstedt, B. (1979) Effect of suture materials on bacterial survival in infected wounds. An experimental study. *Acta Chirurgica Scandinavica* **145**: 431–434.
- Otten, J.E., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Jahnke, H. & Pelz, K. (2005) Bacterial colonization on different suture materials—a potential risk for intraoral dentoalveolar surgery. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B. Applied Biomaterials* **74**: 627–635.
- Parirokh, M., Asgary, S., Eghbal, M.J., Stowe, S. & Kakoei, S. (2004) A scanning electron microscope study of plaque accumulation on silk and PVDF suture materials in oral mucosa. *International Endodontic Journal* **37**: 776–781.

- Pinheiro, A.L., de Castro, J.F., Thiers, F.A., Cavalcanti, E.T., Rego, T.I., de Quevedo, A.S., Lins, A.J. & Aca, C.R. (1997) Using Novafil: would it make suturing easier? *Brazilian Dental Journal* **8**: 21–25.
- Racey, G.L., Wallace, W.R., Cavalaris, C.J. & Marguard, J.V. (1978) Comparison of a polyglycolic-polylactic acid suture to black silk and plain catgut in human oral tissues. *Journal of Oral Surgery* **36**: 766–770.
- Renton-Harper, P., Addy, M., Moran, J., Doherty, F. & Newcombe, R. (1996) A comparison of chlorhexidine, cetylpyridium chloride, triclosan and C31 G mouthrinse products for plaque inhibition. *Journal of Periodontology* **67**: 486–489.
- Selvig, K.A., Biagiotti, G.R., Leknes, K.N. & Wikesjo, U.M. (1998) Oral tissue reactions to suture materials. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **18**: 474–487.
- Senpuku, H., Sogame, A., Inoshita, E., Tsuha, Y., Miyazaki, H. & Hanada, N. (2003) Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology* **49**: 301–309.
- Stillman, R.M., Bella, F.J. & Seligman, S.J. (1980) Skin wound closure. The effect of various wound closure methods on susceptibility to infection. *Archives of Surgery* **115**: 674–675.
- Tomita, N., Tamai, S., Morihara, T., Ikeuchi, K. & Ikada, Y. (1993) Handling characteristics of braided suture materials for tight tying. *Journal of Applied Biomaterials* **4**: 61–65.
- Wallace, W.R., Maxwell, G.R. & Cavalaris, C.J. (1970) Comparison of polyglycolic acid suture to black silk, chromic and plain catgut in human oral tissues. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **28**: 739–746.
- Yaltirik, M., Dedeoglu, K., Bilgic, B., Koray, M., Ersev, H., Issever, H., Dulger, O. & Soley, S. (2003) Comparison of four different suture materials in soft tissues of rats. *Oral Diseases* **9**: 284–286.
- Yu, G.V. & Cavaliere, R. (1983) Suture materials. Properties and uses. *Journal of the American Podiatry Association* **73**: 57–64.

A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*

Lidia Ruiz-Martínez, Lidia López-Jiménez, Valeria d'Ostuni, Ester Fusté, Teresa Vinuesa, Miguel Viñas*

Molecular Microbiology and Antimicrobials Laboratory. Department of Pathology and Experimental Therapeutics. Medical and Dentistry Schools. IDIBELL. University of Barcelona, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Received 15 February 2011 · Accepted 10 March 2011

Summary. This study explored the evolutionary mechanism by which the clinical isolate PA110514 yields the imipenem-resistant derivative PA116136. Both isolates were examined by PFGE and SDS-PAGE, which led to the identification of a new insertion sequence, ISPa133. This element was shown to have distinct chromosomal locations in each of the original isolates that appeared to explain the differences in imipenem susceptibility. In strain PA110514, ISPa133 is located 56 nucleotides upstream of the translational start codon, which has no effect on expression of the porin OprD. However, in strain PA116136 ISPa133 is located in front of nucleotide 696 and, by interrupting the coding region, causes a loss of OprD expression, thus conferring imipenem resistance. In vitro experiments mimicking the natural conditions of selective pressure yielded imipenem-resistant strains in which ISPa133 similarly interrupted *oprD*. A mechanism is proposed whereby ISPa133 acts as a mobile switch, with its position in *oprD* depending on the degree of selective pressure exerted by imipenem. [Int Microbiol 2011; 14(1):51-58]

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* · protein OprD · carbapenems · imipenem · insertion elements · antimicrobial resistance

Introduction

Infections by *Pseudomonas aeruginosa* are a serious clinical problem, particularly in immune compromised hosts in hospital settings [9,29,33]. Moreover, the treatment of these infections is often difficult because of the limited number of effective antimicrobial agents, due to the intrinsic resistance of *P. aeruginosa* strains and their different modes of growth [10]. These properties reflect the synergy between the bac-

terium's low outer-membrane permeability [2,6,38], its chromosomally encoded AmpC β -lactamase [14], and its broadly specific drug efflux pump [11,17,22,23]. Furthermore, *P. aeruginosa* readily acquires resistance to most antimicrobials through mutations in its chromosomal genes and through extrachromosomal elements carrying resistance determinants [14,25]. Although there are several antimicrobials (carbapenems, cefepime, ceftazidime, tobramycin and amikacin) that continue to be effective against *P. aeruginosa*, in the last few years the bacterium's increasing resistance to many others has been reported [4,13,18,28,30].

Carbapenems are a class of β -lactam antibiotics with good antimicrobial activity against *P. aeruginosa* but the emergence and spread of acquired carbapenem resistance in this species have challenged the success of therapeutic and control efforts. Since carbapenems, especially imipenem, are

*Corresponding author: M. Viñas
Feixa llarga s/n. Pavelló de Govern
Campus of Bellvitge, University of Barcelona
08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain
Tel. +34-934024265. Fax +34-934029082
E-mail: mvinyas@ub.edu

widely used in the clinical setting [26], investigation of the molecular mechanisms leading to resistance is crucial. Imipenem resistance can involve low permeability, the activity of an inducible β -lactamase [15], and multidrug efflux systems, but the most widely accepted mechanism involves the loss of the porin OprD from the outer membrane [37], which can occur at the transcriptional or translational level or through the emergence of mutations in the *oprD* gene [20]. For example, in one report, the down-regulation of *oprD* transcription in clinical isolates of *P. aeruginosa* was shown to have occurred by a mechanism involving inactivation of the gene due to the presence of insertion sequence elements (IS) [36]. Additional mechanisms of carbapenem resistance include repressed OprD expression, as is the case in *nfxC*-type mutants, which simultaneously overexpress the MexEF-oprN efflux pump.

The present study resulted from the isolation of two strains of *P. aeruginosa* from the same patient in the course of a chronic respiratory infection. The first strain was obtained soon after the patient was admitted to the University Hospital of Bellvitge (L'Hospitalet, Barcelona, Spain). The infection was successfully treated with imipenem. The second strain was obtained 6 days later, from the patient's rectum. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of the two isolates were identical, as were the results of biochemical tests aimed at their identification. However, determination of antibiotics susceptibility demonstrated that the isolates were identical for all antibiotics tested except imipenem: the first isolate was imipenem susceptible whereas the second was imipenem resistant. Thus, aim of this study was to search for underlying changes in the isolates' DNA that could account for the difference in imipenem susceptibility, starting from the hypothesis that resistance was mediated by a loss of OprD expression on the outer membrane.

Materials and methods

Bacterial strains. The two studied clinical isolates of *P. aeruginosa* were isolated from a patient at the Servei de Microbiologia of the Hospital Universitari de Bellvitge. PA110514 was isolated before imipenem treatment was started, and strain PA116136 after the patient had received the full course of the antibiotic. *P. aeruginosa* PA9 was used as the positive control for amplification of the *oprD* gene. Strains PA132325 and PA138635, susceptible and resistant to imipenem, respectively, were used as controls in preparing extracts of outer membrane proteins (OMPs). *P. aeruginosa* strains PAFL2, PAFL4, PAFL8, PAFL12, and PAFL16 are the resistant mutants obtained in this study. All of the bacterial strains were cultured in trypticase soy broth (TSB) or on trypticase soy agar (TSA). Bacteriological media were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain).

Pulsed-field gel electrophoresis. To compare the different strains, PFGE was carried out as follows: DNA was extracted and purified as described elsewhere [28,31]. *SpeI*, a low-frequency restriction enzyme, was used according to the manufacturer's specifications (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). The *SpeI* DNA restriction fragments were separated in a CHEF-DR III unit (Bio Rad, Hercules, CA, USA) for 20 h at 14°C and 6 Volts/cm, with pulse times ranging from 0.5 to 25 s. Strain relatedness was assigned in accordance with published criteria [32]. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was used as the control in sequence analysis (accession number Z14065.1)

Minimum inhibitory concentration (MIC) determinations. Antimicrobial susceptibility was tested using the microdilution method, with Mueller-Hinton broth (Scharlab, Barcelona, Spain), according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The following antimicrobials were tested: piperacillin, piperacillin/tazobactam, ticarcillin, aztreonam, gentamicin, tobramycin, amikacin, trimethoprim/sulfamethoxazol, ciprofloxacin, ofloxacin, ceftazidime, cefepime, imipenem, and meropenem. The antibiotics were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Outer membrane preparations and SDS-PAGE. Whole bacterial proteins and OMPs were obtained as described elsewhere [24,27]. SDS-PAGE was performed, using a modification of the method of Laemmli, in a Bio-Rad apparatus (Mini-Protein II). Gels were stained with 0.25% Coomassie brilliant blue, destained, and then dried on a gel dryer (Biorad 543) [8,12].

Gene *oprD* amplification. To obtain *P. aeruginosa* genomic DNA, 5 ml of Luria broth inoculated with a single colony was incubated overnight at 37°C. Bacteria were harvested by centrifugation and suspended in 180 μ l of ATL buffer from the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Germany), which was used for DNA purification following the manufacturer's instructions. A modified version of the PCR assay previously described [36] was used to amplify *oprD*. Reaction mixtures had a final volume of 50 μ l and contained 2 μ l (1/10th volume) of genomic DNA, 0.5 μ M of the OprDSEQF1 forward primer (5'-CTACGACAGATGCGACATGC-3'), 0.5 μ M of the OprDSEQR1 reverse primer (5'-CCTTTATAGCGCGTTGCC-3') (Invitrogen, USA), 1 U of Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (Fermentas, Lithuania), 1 \times PCR buffer, and 2 mM MgCl₂. Amplification was achieved in a Techne (Staffordshire, UK) thermocycler model TC-312 during 25 cycles, each consisting of 30 s at 95°C, 30 s at 56°C, and 2 min at 72°C. Final extension was performed at 72°C for 10 min. PCR products were separated by agarose-gel (1.5% w/v) electrophoresis in Tris-borate buffer (TBE) at 9 Volts/cm for 1.5 h and visualized using ethidium bromide.

DNA sequencing and analysis of sequence data. Sequence data for *oprD* were obtained by using the primers OprDSEQF1 and OprDSEQR1. PCR products were purified with the MinElute PCR purification kit (Qiagen, Germany) prior to sequencing. The ABI PRISM BigDye Terminator (version 3.1) Cycle Sequencing Ready Reaction kit and ABI PRISM(R) 3700 DNA analyzer were used (Applied Biosystems, USA). Database searches were conducted using the basic local alignment search tool (BLAST) [1] and multiple alignments carried out with CLUSTAL W [34].

In vitro generation of imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Approximately 10⁵ *P. aeruginosa* PA110514 cells were used to inoculate 20 ml of MHB medium with imipenem concentrations ranging from 0.5 to 16 μ g/ml. After 24 h of incubation at 37°C, resistant derivatives (MICs = 6–16 μ g/ml) were selected by spreading

Table 1. Susceptibilities to antimicrobial agents tested against *Pseudomonas aeruginosa* PA110514 and PA116136

Antibiotics	Strain PA110514		Strain PA116136	
	MIC*	Susceptibility	MIC	Susceptibility
piperacillin	<16	S	<16	S
piperacillin/tazobactam	<16	S	<16	S
ticarcillin	<16	S	<16	S
aztreonam	2	S	2	S
gentamicin	<4	S	<4	S
tobramicin	<4	S	<4	S
amikacin	<8	S	<8	S
trimethoprim/sulfamethoxazol	<2/38	S	>2/38	R
ciprofloxacin	<0.12	S	<0.12	S
ofloxacin	<0.5	S	<0.5	S
ceftazidime	<1	S	<1	S
cefepime	<1	S	<1	S
imipenem	<1	S	>8	R
meropenem	<4	S	<4	S

*MICs are expressed in µg/ml.

0.01 ml of the overnight culture onto MHA plates (Scharlab, Barcelona, Spain) containing the appropriate concentration of imipenem. Repeated exposure to the antibiotic was continued with the most resistant derivatives until an increase in the minimum inhibitory concentration (MIC) of imipenem to 16 µg/ml was achieved.

Nucleotide sequences accession numbers. The nucleotide sequences reported herein have been submitted to GenBank databases. The accession numbers for the ISPa133 found in strains PA110514 and PA116136 are FJ387165.2 and FJ387166.2, respectively.

Results

Minimum inhibitory concentration determinations. Antimicrobial susceptibilities were determined in MIC tests, with the results shown in Table 1. *P. aeruginosa* strain PA110514 was found to be susceptible to all tested antibiotics while *P. aeruginosa* strain PA116136 was resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and imipenem.

Outer-membrane protein profile. Electrophoretic comparisons of OMPs from both strains demonstrated, as expected, that the susceptible strain, *P. aeruginosa* PA110514, but not the resistant strain, PA116136, showed a visible band corresponding to the porin OprD in the outer membrane (Fig. 1). To investigate the mechanism responsible for the loss of OprD expression, the *oprD* genes of both

strains were amplified and sequenced and their sequences compared.

Gene *oprD* amplification. The amplicons obtained from the *oprD* gene region of strains PA110514 and PA116136 were larger than that of strain PA9 used as positive control (Fig. 2). The predicted length of *oprD* is 1586 bp, while the amplicons from PA110514 and PA116136 were 3000 and 2000 bp, respectively. Sequence analysis of both amplicons revealed the presence of a long insert, approximately 1300 bp, with a 59.6% G + C content. The insert, designated ISPa133, showed high homologies with the mobile elements of the IS3 family of insertion sequences. The similarities were not only in terms of the length of the ISPa133, which for members of the IS3 family is typically between 1200 and 1550 bp, but due to the presence of two characteristic open reading frames (ORF), *orfA* and *orfB*, which, unusually, did not overlap (Fig. 3). The insertion element was flanked by 25-bp terminal inverted repeats (IRs), with TG at the 5' end and CA at the 3' end, as in other members of the IS3 family. Another general feature of IS elements is that, on insertion, most generate short directly repeated sequences (DR) of the target DNA flanking the IS, but these were not detected in ISPa133.

The first ORF (*orfA*) encodes a transposase (Fig. 3). In the search for conserved domains [16], we determined that

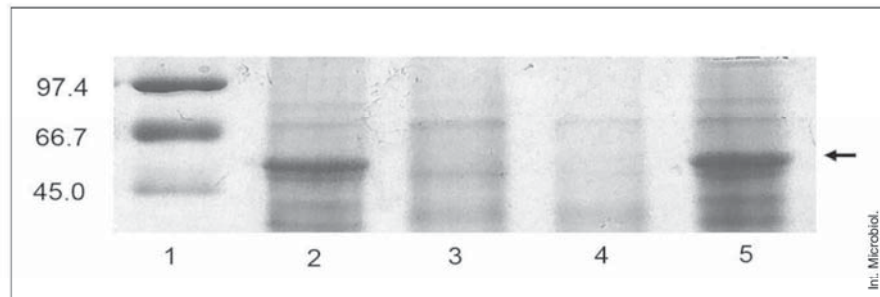


Fig. 1. Outer membrane protein profiles. Black arrows indicate the position of OprD. Lane 1: SDS-PAGE standards, (Low Range, Bio-RAD, USA); lane 2: strain PA110514; lane 3: strain PA116136; lane 4: strain PA138635 (imipenem-resistant control); lane 5: strain PA132325 (imipenem-susceptible control).

the protein includes a helix-turn-helix motif (HTH), a family of DNA-binding domains unique in bacteria, and that it showed high identity to the transposase 8 family, some of which are members of the IS3 family. The second ORF, *orfB*, encodes the central catalytic domain of an integrase from the rve super-family [http://pfam.sanger.ac.uk/family PF00665]. Integrase mediates the integration of a DNA copy of the viral genome into the host chromosome. The enzyme is composed of three domains. The amino-terminal zinc-binding domain (pfam02022) is the central catalytic domain. The carboxyl terminal domain is a non-specific DNA binding domain (pfam00552). The catalytic domain acts as an endonuclease when two nucleotides are removed from the 3' ends of the blunt-ended viral DNA resulting from reverse transcription. This domain also catalyzes the DNA-strand-transfer reaction

of the 3' ends of the viral DNA to the 5' ends of the integration site.

While the large insert located in PA116136 was 99% identical to that found in PA110514, its location in *oprD* was different. In PA110514, ISPa133 was located 56 nucleotides upstream of the translational start codon, but in PA116136 it occurred immediately before nucleotide position 697, effectively replacing this nucleotide and causing the removal of the first 232 amino acids of the porin OprD (Fig. 4).

In vitro generation of imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Repeated exposure of *P. aeruginosa* PA110514 to imipenem allowed the selection of several defective OprD mutants. When *oprD* was amplified using DNA from cultures resistant to imipen-

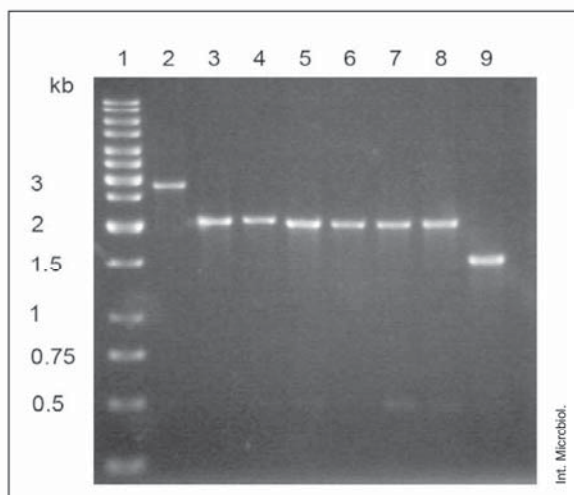


Fig. 2. PCR amplification products obtained with primers OprDSEQF1 and OprDSEQR1. Fragments were separated by electrophoresis through a 1.5% agarose gel. Lane 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Lane 2: strain PA110514. Lane 3: strain PA116136. Lane 4: strain PAFL2. Lane 5: strain PAFL4. Lane 6: strain PAFL8. Lane 7: strain PAFL12. Lane 8: strain PAFL16. Lane 9: strain PA9, used as positive control.

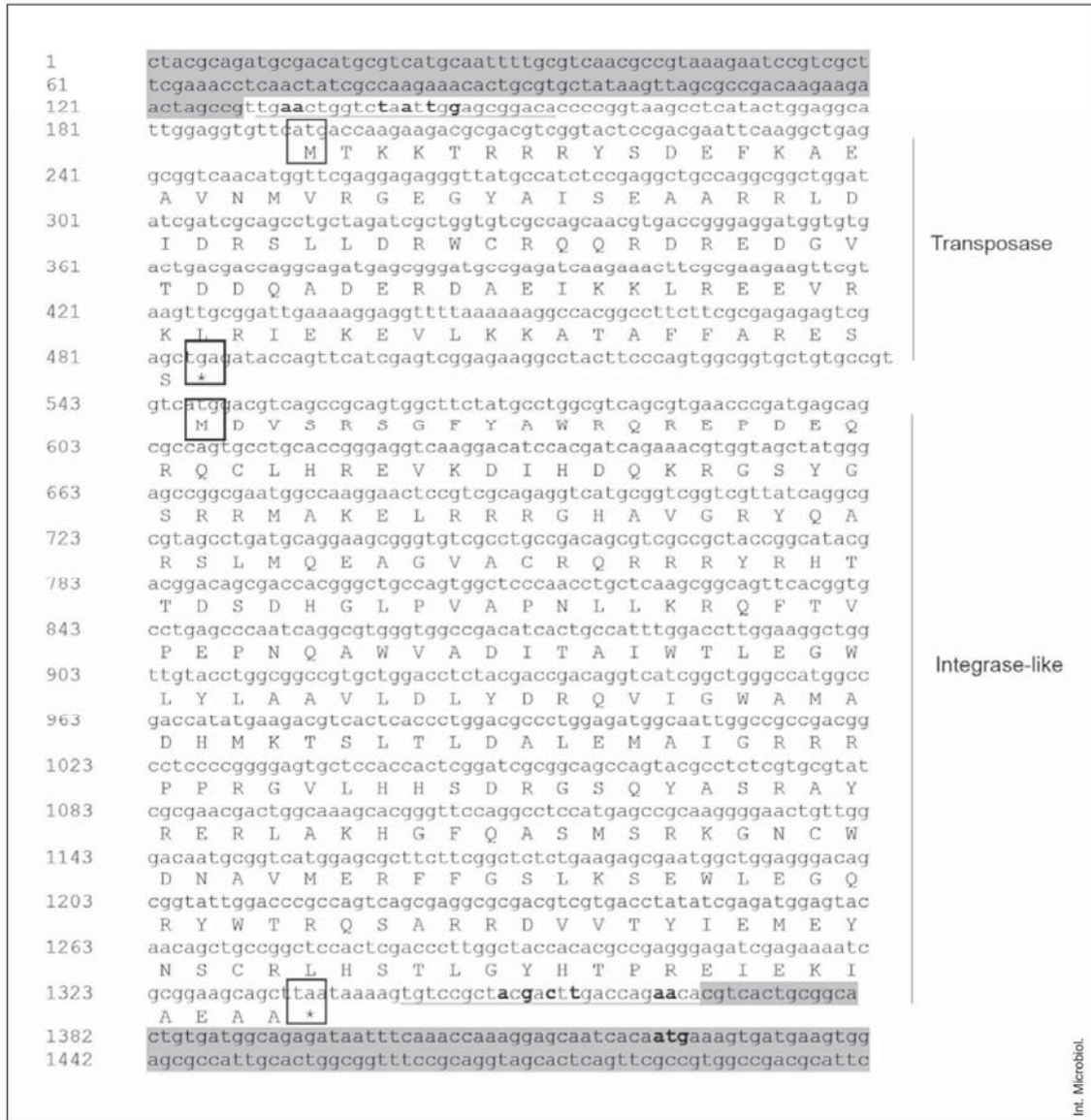


Fig. 3. Nucleotide sequence of de novel IS3-like element, ISPa133, present in strain PA110514 and its proposed derivative PA116136. The underlined sequences represent the 25-bp inverted repeats (IRs). Bold letters within the IRs indicate mismatches between left and right IRs. Translational start and stop codons of both *orfs* encoded by the mobile element are boxed; the amino acid sequence of the two open reading frames are shown below the sequence. Shaded regions represent the sequence of the *oprD* gene flanking the IS element.

em concentrations 2, 4, 8, 12, and 16 times higher than the MIC value for PA110514, an amplicon of 2000 bp was obtained, i.e., identical in size to the amplicon of the resistant clinical isolate PA116136. Sequencing of the amplicon

revealed the presence of ISPa133. The position of the insertion element in the mutants was not the same as in PA110514 and PA116136. In the mutant strain PAFL2, ISPa133 was located immediately before nucleotide position 667, replac-

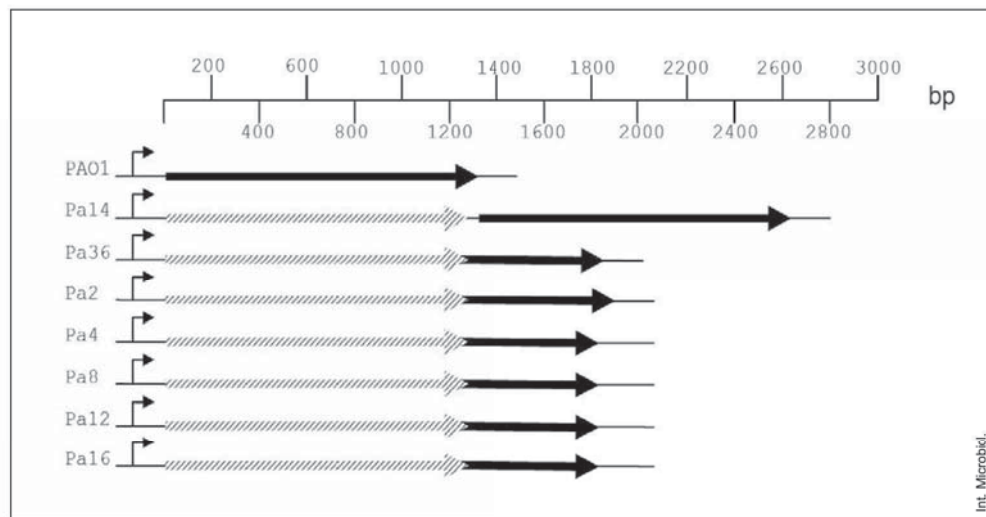


Fig. 4. Schematic diagram of the locations of the ISPa133 element with respect to the *oprD* gene. The solid arrow represents the *oprD* structural gene while the striped arrow represents ISPa133.

ing the first 222 amino acids of the porin, but in PAFL4 and in the rest of resistant strains, it was located just before nucleotide 703, causing the removal of the first 234 amino acids of OprD (Fig. 4).

Discussion

Carbapenems are a class of β -lactam antibiotics with good antimicrobial activity against *P. aeruginosa*; as such, they are often used as a last resort in infections due to multidrug-resistant strains of the bacterium [21]. However, the emergence and spread of acquired carbapenem resistance have challenged therapeutic and control efforts [5], necessitating a better understanding of the molecular mechanisms underlying resistance. Moreover, it seems likely that several mechanisms are involved in carbapenem resistance [7].

The two clinical isolates of this study, PA110514 and PA116136, were identical in their PFGE profiles and in biochemical tests, suggesting their close relationship. The unique noticeable difference between the isolates was in their susceptibility to imipenem. Our hypothesis, that this difference involved the OMPs, was supported by the results of SDS-PAGE, which revealed the loss of OprD in PA116136 (Fig. 1) and suggested that this strain was a PA110514 derivative. To investigate the mechanism responsible for the loss

of the porin, the *oprD* gene of each strain was amplified and sequenced. Examination of these sequences revealed the presence of a new insertion sequence, ISPa133, located 56 nucleotides upstream of the *oprD* start codon in PA110514. However, since this isolate is imipenem-susceptible, the presence of ISPa133 has no obvious effect on the upstream regulatory region of the gene, as *oprD* expression was normal (Fig. 1) as was the expression of the porin OprD. By contrast, in PA116136, the insertion element (99% identity) is located immediately before nucleotide position 696, which causes the removal of the first 232 amino acids of OprD. Consequently, the protein is not expressed and was not detectable in the gels (Fig. 1). Since loss of the protein prevents the entrance of imipenem, strain PA116136 is resistant to the antibiotic.

To date, the presence of ISs in OprD has been reported only once, although these elements have been detected in other genes of *P. aeruginosa* [3,4,28]. In those cases, the ISs were described in resistant isolates and thus assumed to be the cause of resistance, either via gene activation or by inducing the high level expression of a potential resistance gene. Based on the findings in the two clinical isolates analyzed in this study, we propose that the newly identified insertion element ISPa133 acts as a switch, depending on the degree of selective pressure exerted by imipenem. In the absence of selective pressure, as was the case during isolation of strain PA110514 from an infected, untreated patient, OprD is found

on the OM and the position of ISPa133 in the genome has no effect on *oprD* expression; however, selective pressure exerted by antibiotic therapy results in the selection of strains in which ISPa133 moves within the *oprD* gene, such that, in the case of strain PA116136, the first 232 amino acids are removed, thus preventing expression of the gene. A high rate of ISPa133 jumping would therefore provide a major selective advantage, one that allows the bacterium to survive in the presence of carbapenems.

It has been proposed that ISs without DRs may simply result from the homologous inter- or intra-molecular recombination between two IS elements, each with a different DR sequence, or from the formation of adjacent deletions arising from duplicative intramolecular transposition [35]. For ISPa133, this could explain the lack of DRs as well as the absence of a crossover region between *orfA* and *orfB*.

As shown in other species, experiments mimicking natural conditions can provide insight into population phenomena [19]. This was the aim of our experiments in which strain PA110514 was submitted to selective pressure by imipenem in culture flasks in order to obtain spontaneous resistant mutants in vitro with properties similar or identical to those of the strains isolated from a patient hospitalized with a *P. aeruginosa* infection. Indeed, mutants with levels of resistance similar to those of strain PA116136 were easily recovered. Moreover, when the experiments were prolonged, the MICs of the isolates were even higher (16 µg/ml).

Note that, according to the above-proposed mechanism of action, removal of the selective pressure exerted by the antibiotic should restore bacterial susceptibility to carbapenems through the expression of the full-length *OprD*; whether this is the case remains to be determined. However, this change would not be expected to occur as quickly as the acquisition of resistance, since the selective advantage conferred by imipenem resistance in the presence of the antimicrobial is severe whereas *OprD* expression is likely to be evolutionarily advantageous only under certain environmental conditions.

Acknowledgements. The generous permission to use the equipment of the *Servei de Microbiologia* of the Hospital Universitari de Bellvitge de Barcelona is gratefully acknowledged, as is the gift of the bacterial strains. A portion of the imipenem used in this study was kindly supplied by Merck Sharp & Dome. We thank Jose Pedro Martinez for critical reading of the manuscript.

Funding: BFU2006-12268/BFI from the Spanish Ministry of Science and Technology/FEDER to MV.

Competing interests: None declared.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
- Angus BL, Carey AM, Caron DA, Kropinski AMB, Hancock REW (1982) Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrob Agents Chemother* 21:299-309
- Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Hoiby N (2002) Constitutive high expression of chromosomal β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3406-3411
- Boonkerd N, Pibalpakdi P, Tiloklurs M, Niumsup PR (2009) Class 1 integron containing metallo β -lactamase gene IMP-1 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *J Infect Chemother* 15:257-261
- Carmeli Y, Lidji SK, Shabtai E, Navon-Venezia S, Schwaber MJ (2011) The effects of group 1 versus group 2 carbapenems on imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an ecological study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:367-372
- Dörner U, Schiffler M, Lanéelle M-A, Daffé M, Benz R (2009) Identification of a cell-wall channel in the corynemycolic acid-free gram-positive bacterium *Corynebacterium amycolatum*. *Int Microbiol* 12:29-38
- El-Amin N, Giske CG, Jalal S, Keijsjer B, Kronvall G, Wretling B (2005) Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin *OprD* and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS* 113:187-196
- Fenosa A, Fusté E, Ruiz L, Veiga-Crespo P, et al (2009) Role of TolC in *Klebsiella oxytoca* resistance to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 63:668-674
- Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA (2011) Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest* 139:909-919
- Khan W, Bernier SP, Kuchma SL, Hammond JH, Hasan F, O'Toole GA (2010) Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide. *Int Microbiol* 13:207-212
- Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC. (1997) Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 23:345-354
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lister PD, Wolter DJ, Wickman PA, Reisbig MD (2006) Levofloxacin/imipenem prevents the emergence of high-level resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains already lacking susceptibility to one or both drugs. *J Antimicrob Chemother* 57:999-1003
- Livermore DM, Yang YJ (1987) β -Lactamase lability and inducer power of newer β -lactam antibiotics in relation to their activity against β -lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 155:775-782
- Livermore DM (1992) Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 36:2046-2048
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK et al. (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37:205-210
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T (2000) Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrin-

- sis resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2242-2246
18. McGowan JE (2006) Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med* 119:S29-36
 19. Orús P, Viñas M (2000) Transfer of penicillin resistance between *Neisseriae* in microcosm. *Microb Drug Resist* 6:99-104
 20. Pirnay JP, De Vos D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P, Zizi M (2002) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* 4:872-882
 21. Poissy J, Senneville E (2011) New antibiotics for severe ICU-acquired bacterial infections. *Infect Disord Drug Targets*. Jun 16. PubMed ID 21679140
 22. Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, et al. (1996) Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 21:713-724
 23. Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S (1993) Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 175:7363-7372
 24. Puig M, Fusté C, Viñas M (1993) Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* 39:108-111
 25. Qiu X, Kulasekara BR, Lory S (2009) Role of horizontal gene transfer in the evolution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Genome Dyn* 6:126-139
 26. Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, Del Campo R, Juan C, Cantón R, Oliver A (2011) *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother* Jun 8. DOI:10.1093/jac/dkr232
 27. Rojas L, Vinuesa T, Tubau F, Truchero C, Benz R, Viñas M (2006) Integron presence in a multiresistant *Morganella morganii* isolate. *Int J Antimicrob Agents* 27:505-512
 28. Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas M (2011) Class I integrons in environmental and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* (in press)
 29. Ruiz L, Domínguez MA, Ruiz N, Viñas M (2004) Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch Med Res* 35:251-257
 30. Sánchez-Romero I, Cercenado E, Cuevas O, García-Escribano N, García-Martínez J, Bouza E (2007) Evolution of the antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: Second National Study (2003). *Rev Esp Quimioter* 20:222-229
 31. Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75
 32. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-2239
 33. Termine E, Michel GPF (2009) Transcriptome and secretome analyses of the adaptative response of *Pseudomonas aeruginosa* to suboptimal growth temperature. *Int Microbiol* 12:7-12
 34. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
 35. Turlan C, Chandler M (1995) *IS1*-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replicative deletions. *EMBO J* 14:5410-5421
 36. Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD (2004) Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett* 236:137-143
 37. Yoneyama H, Nakae T (1993) Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:2385-2390
 38. Yoshimura F, Nikaído H (1982) Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J Bacteriol* 152:636-642



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>

Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[☆]

L. Ruiz-Martínez^a, L. López-Jiménez^a, E. Fusté^a, T. Vinuesa^a, J.P. Martínez^b, M. Viñas^{a,*}^aLaboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona–IDIBELL, Campus de Bellvitge, L'Hospitalet, Barcelona, Spain^bDepartment of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2010

Accepted 13 June 2011

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa

Antimicrobial resistance

Class 1 integrons

ABSTRACT

The aims of this study were to ascertain the presence and spread of class 1 integrons amongst environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and to characterise their variable regions. A total of 76 isolates (56 clinical and 20 environmental) were studied. The presence of plasmids was explored, and polymerase chain reaction (PCR) was used for integron detection. All amplicons were sequenced. PCR detected class 1 integrons in 26 of the 56 clinical isolates; environmental isolates were integron-free. No plasmids were found, thus all the integrons found are possibly on the chromosome. Most isolates presented one amplicon, except PA110514 and PA116136, which showed two PCR products each. Variable regions revealed that 18 strains carried only one gene involved in aminoglycoside resistance, whereas in 3 strains gene cassettes were not found. The most prevalent cassettes amongst isolates were those encoding aminoglycoside adenyltransferase B (*aadB*). Several of the strains had acquired the same or a highly similar cassette array as those detected in geographically distant *P. aeruginosa*. This finding suggests that contact with bacterial reservoirs contributes to the evolution of this pathogen towards multiresistance. Empty structures found may represent a reservoir increasing the capacity to adapt to the environment. However, these integrons are not retained when the selective pressure disappears. It is hypothesised that integrons containing gene cassettes are crucial vehicles for the rapid horizontal transfer of resistance. If this is so, reduced use of antibiotics may lead to a significant decrease in the carriage of integrons amongst *P. aeruginosa* strains.

© 2011 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is noted not only for its metabolic versatility and its exceptional capacity to adapt to and colonise a wide variety of ecological environments (water, soil, rhizosphere, animals), but also for its intrinsic resistance to a broad range of antimicrobial agents. Infections by *P. aeruginosa* are often difficult to treat because of its virulence and

the relatively limited availability of effective antimicrobial agents. Nosocomial infections caused by *P. aeruginosa* frequently occur in ventilated and immunocompromised patients in Intensive Care Units [1,2]. Opportunistic infections caused by this pathogen can result from immunosuppression, which enhances the virulence of strains with low pathogenicity. Several studies have addressed the structure of *P. aeruginosa* populations [3–5].

Multiresistance of *P. aeruginosa* has been extensively described and involves components such as outer membrane proteins (OMPs), β -lactamases and other antibiotic-modifying enzymes, and efflux pumps. In the course of a population study of *P. aeruginosa* isolated in the hospital setting, we explored the basis of the resistance shown by this pathogen.

Increasing attention has been given to integrons in the context of resistance to antimicrobials. In particular, much research effort has been devoted to integrons belonging to classes 1, 2 and 3, the classes most commonly associated with the spread of antibiotic resistance in pathogens. Whilst integrons generally pose a problem for the management of spread of resistance, they are especially common in pathogenic bacteria [6]. Surveys examining the prevalence of various genetic elements in multidrug-resistant strains invariably

[☆] Nucleotide sequences accession nos.: The nucleotide sequences reported in this paper have been submitted to GenBank databases. The accession nos. for all the sequences are: In141, HM367607; In361, HM367608; InB, HM367609; In17, HM367610; In18, HM367611; In19, HM367612; In13, HM367613; In19, HM367614; In122, HM367615; In128, HM367616; In130, HM367617; In133, HM367618; In134, HM367619; In135, HM367620; In169, HM367621; In176, HM367622; In177, HM367623; In187, HM367624; In193, HM367625; InP18, HM367626; In199, HM367627; InP1, HM367628; and InP4, HQ157204.

* Corresponding author. Present address: Campus de Bellvitge, University of Barcelona, Feixa llarga s/n, Pavelló de govern, E-08907 L'Hospitalet (Barcelona), Spain. Tel.: +34 934 024 265; fax: +34 934 029 082.
E-mail address: mviñas@ub.edu (M. Viñas).

show a high correlation between the presence of a class 1 integron and particular antimicrobial resistance profiles. Most notable amongst these is resistance to ampicillin and streptomycin, and particularly to trimethoprim and sulfamethoxazole (SMX) [6,7]. In the case of class 1 integrons, SMX resistance is normally derived from *sul1*, which is located in a region downstream of the integron called the 3'-conserved segment (3'-CS), a region present in most class 1 integrons isolated from clinical environments [8,9]. Consequently, SMX resistance is a common feature of strains that carry class 1 integrons. The class 1 integrons that carry drug resistance genes in clinical isolates have a relatively conserved structure, which commonly comprises two conserved DNA sequences (5'-CS and 3'-CS) separating a variable region where mobile gene cassettes are located [10]. This arrangement has been used as a polymerase chain reaction (PCR) tool for the simple recovery of cassette arrays irrespective of knowledge of the many and varied cassettes that may be present [11,12]. In addition to recovering and analysing cassettes from specific isolates, PCR has also been used as a tool in broader epidemiological studies [13]. However, this method has some limitations. First, some class 1 integrons from clinical isolates do not have part or all of the 3'-CS, or alternatively they may carry a very large array of cassettes, thereby preventing detectable amplification. Either outcome can generate a false-negative result. In addition, PCR array length analysis alone underestimates cassette diversity since some array combinations may be similar or even identical in length [14]. Also, given that lateral gene transfer is mediated by a number of types of elements, the combinatorial exchange and spread of integron cassette arrays can occur in a variety of ways, including homologous recombination, transposition and even non-integron-mediated site-specific recombination. Thus, research into integron cassette arrays in the absence of context may not give a truly accurate picture of the processes that influence the spread of resistance genes in pathogenic bacteria [9].

Here we detected and characterised the integrons carried by a group of *P. aeruginosa* isolates of clinical and environmental origin [5].

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

A total of 56 clinical and 20 environmental *P. aeruginosa* isolates were studied. Clinical strains were isolated by the Servei de Microbiologia of the Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona, Spain). Environmental isolates were obtained from samples of water and fomites in the hospital setting, as described elsewhere [5]. All bacteriological media were obtained from Scharlab, S.L. (Barcelona, Spain).

2.2. Minimum inhibitory concentration determination

Antimicrobial susceptibility testing was performed using the microdilution method in Mueller–Hinton broth following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [15,16]. The following antimicrobials were tested: piperacillin; piperacillin/tazobactam; ticarcillin; aztreonam; gentamicin; tobramycin; amikacin; trimethoprim/sulfamethoxazole; ciprofloxacin; ofloxacin; ceftazidime; cefepime; meropenem; imipenem; and ampicillin. Antibiotics were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), except for cefepime, which was from Bristol-Myers Squibb (Rueil-Malmaison, France). For some strains, the disk diffusion method with Mueller–Hinton agar was also performed. Disks were purchased from Oxoid Ltd. (Basingstoke, UK). Strains were classified as susceptible or resistant following the CLSI guidelines [15].

2.3. Plasmid isolation

Two strategies were used to obtain plasmids from the strains. In the first, conventional plasmids were detected by the alkaline lysis method described by Feliciello and Chinali [17]. Briefly, cells were lysed with sodium hydroxide/sodium dodecyl sulphate (NaOH/SDS), followed by precipitation of the cell lysate with 2 M potassium acetate/1 M acetic acid, and precipitation of the resulting supernatant with isopropanol. Finally, the precipitate was treated with RNase and was once again precipitated with isopropanol. The second method, for detecting megaplasmids, consisted of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of genomic DNA using the method described by Barton et al. [18]. Briefly, bacteria were embedded in agarose gel and were lysed using a rapid protocol. After this, plugs were incubated with S1 nuclease (Fermentas, Vilnius, Lithuania) and were subjected to PFGE in agarose gels in a CHEF-DR III unit (Bio-Rad, Hercules, CA) for 14 h at 14 °C and 6 V/cm with pulse times of 45 s, and for 6 h at 14 °C and 6 V/cm with pulse times of 25 s. Electropherograms were visualised by ethidium bromide staining as described elsewhere [5].

2.4. Detection and analysis of integrons

DNA extraction for integron detection was performed by a modification of the method described by Lévesque et al. [11]. Briefly, strains were grown overnight in 10 mL of brain-heart infusion (Scharlab, S.L.) with 10% glycerol in the presence of a selective antibiotic at 37 °C. After diluting the culture 1:5 with distilled water, the bacterial suspension was boiled for 10 min and was then centrifuged at 12000 × g for 2 min. The supernatant was used for PCR analysis. PCR was carried out in a 100 µL volume containing 250 µM dNTP (Fermentas), 2.5 pmol of each primer (5'CS, 5'-GGCATCCCAAGCAGCAAG-3'; and 3'CS, 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3') (Invitrogen, Camarillo, CA), 1 × PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) and 30 µL of freshly prepared bacterial suspension. Amplification was achieved as follows: initial denaturation at 94 °C for 12 min, followed by a three-step profile of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 5 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles; 5 s were added to the extension time at each cycle. A final extension at 72 °C was carried out for 5 min and following this step all completed reactions were maintained at 4 °C. All reactions were performed in a GeneAmp® PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR products were electrophoresed at 100 V for 1.30 h on a 0.7% (w/v) Tris–borate–EDTA buffer (TBE) agarose gel and viewed by ethidium bromide staining as described elsewhere.

2.5. DNA sequencing and analysis of sequence data

Sequence data for the amplicons were obtained with primers 5'CS and 3'CS. For isolates PA110514, PA116136, P18 and P4, it was necessary to design additional internal primers in order to amplify variable regions of integrons [for cassettes InA1/InP18, primers 5'-A18L (GTGCAGAGAATGATCAGC), 5'-A18L2 (CCTCCACATCGTGAA) and 5'-A18LR (TCTGTGGCGATGCACCA); and for cassette InP4, primer 5'-A4L (CTCCATAAGGTCATTGAGCA)]. PCR products were purified with a MinElute® PCR Purification Kit (QIAGEN, Crawley, UK) prior to sequencing. An ABI PRISM BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer were used (Applied Biosystems). Database searches were conducted using the basic local alignment search tool (BLAST) [19].

3. Results and discussion

The genetic relationship between some of the isolates studied was analysed previously both by PFGE and polyacrylamide gel elec-

Table 1
Susceptibility of 76 *Pseudomonas aeruginosa* isolates to the antimicrobial agents tested.

Susceptibility	% of isolates									
	TZP	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	GEN	TIC	AMP	CIP
Susceptible	80.3	51.3	56.6	60.5	40.8	65.8	48.7	57.9	82.9	53.9
Intermediate	11.8	26.3	31.6	7.0	5.3	5.3	11.8	2.6	7.9	1.0
Resistant	7.9	22.4	11.8	31.6	53.9	28.9	39.5	39.5	9.2	45.1

TZP, piperacillin/tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; MEM, meropenem; GEN, gentamicin; TIC, ticarcillin; AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin.

trophoresis (PAGE) of OMPs showing a first cluster including four strains (three of clinical and one of environmental origin), a second cluster that also included clinical and environmental isolates, as did a third cluster.

An additional cluster with a high degree of diversity was formed only by environmental isolates, although distance suggested a poor relationship amongst them. Thus, measurement of genetic diversity by PAGE of OMPs disagrees with results from PFGE. Assuming that the outer membrane constituted a permeability barrier with a key role in antibiotic resistance, only some OMP combinations were expected to survive in hospitalised patients. Therefore, in this case selective pressure acted in the opposite manner, leading to lower diversity amongst clinical isolates, although genetic diversity as measured by PFGE was higher in this group [5].

Susceptibility to antimicrobials as percentage resistant, intermediate and susceptible strains is shown in Table 1. When the presence of plasmids was explored either by alkaline lysis or S1-PFGE, all strains gave negative results. Thus, although we cannot confirm that these isolates are plasmid-free, it is feasible that the presence of plasmids is rare, which suggests that all the integrons found are on the chromosome.

The search for class 1 integrons by PCR using primers 3'CS and 5'CS, which led to the amplification of only the variable region (gene cassettes), resulted in the detection of class 1 integrons in 26 of the 56 clinical isolates.

Environmental strains were free of resistance and were completely integron-free. This observation may be a consequence of the lower capacity of these strains to acquire integrons or may simply imply that they do not interact with integron-bearing organisms. The prevalence of class 1 integrons amongst isolates decreases significantly as their origin lies progressively further from human influence. We thus conclude that antibiotics exert the main pressure that selects for and maintains the integrons.

Amongst integrons, class 1 integrons have received the greatest attention. They have been proposed to be largely involved in the dissemination of antibiotic or disinfectant resistance amongst clinical isolates; in fact, ca. 75% of clinical isolates carry at least one integron of this class [8,9].

The largest amplicon (3000 bp) was found in strain P4, whereas in P1 and P18 amplicons of ca. 2500 bp were detected, whilst isolates cc, cd and 28 gave amplicons of ca. 1000 bp. Isolates 7, 19, 22, 30, 33, 69, 76, 77, 87, 93, 99, cm, cn, co and B' had integrons giving amplicons of ca. 750 bp. Isolates cb, 17 and 26 showed the smallest amplicons (ca. 200 bp). Finally, PA110514 and PA116136 (an imipenem-resistant derivative of PA110514) showed two PCR products in each strain, thereby suggesting the presence of two integrons in each; the amplicon lengths corresponding to the sizes of the variable regions were 2500 bp and 400 bp. Gene cassettes were not detected in all the integrons (Table 2).

Direct sequencing of the variable region revealed that 18 strains carried only one resistance gene involved in aminoglycoside resistance. The most prevalent cassettes amongst isolates were those encoding aminoglycoside adenylyltransferase (*aad*).

The cassette most commonly found in integrons was *aadB* (strains 7, 19, 22, 30, 33, 69, 76, 77, 87, 93, 99, cm, cn,

co and B'). This cassette encodes for the aminoglycoside-2'-*O*-adenylyltransferase that confers resistance against kanamycin, gentamicin and tobramycin. *aadA7* was present in three strains (cc, cd and 28) and encodes for aminoglycoside adenylyltransferase conferring resistance to streptomycin and spectinomycin. Sequencing revealed a high prevalence of genes conferring resistance to streptomycin and spectinomycin in the integrons. The former is used in clinics (e.g. to treat tuberculosis) and the second has been widely used as a growth promoter in food-producing animals. These uses thus result in an increase in selective pressure [20,21].

Sequencing of amplicons from strains P1, P4, PA110514, PA116136 and P18 revealed that the variable region contained a cassette array with various open reading frames (ORFs). The cassette array of P1 had three ORFs, all involved in aminoglycoside resistance; *aadB* encoding aminoglycoside-2'-*O*-adenylyltransferase that confers resistance to kanamycin, tobramycin and gentamicin; and *aadA11* encoding aminoglycoside-3'-adenylyltransferase that confers resistance to streptomycin and spectinomycin. The third, named *orfE*, encodes an aminoglycoside-2''-adenylyltransferase that belongs to the conserved bacterial family pfam10706 and superfamily cl11303. The proteins included in these two families are involved in resistance to kanamycin, gentamicin and tobramycin and remove the synergism between aminoglycosides and cell wall-active agents. This cassette array also occurs in the integron In2345 (AY758206) of *P. aeruginosa* strain PA2345, isolated in the University Hospital of Besançon (France) [22], and both integrons share 100% identity for *aadB* and *orfE* and 98% for *aadA11*. Furthermore, the high similarity between sequences from bacterial isolates from different geographic regions suggests frequent global and cross-species spread of this cassette complex.

Strain P18 contained a cassette array with three ORFs, *orfL*, *tetR* and *orfJ*, in that order, and its variable region was identical to that of the largest amplicon present in strains PA110514 and PA116136. *orfL* encodes a phage integrase-like protein with an identity of 79% with the protein already described in plasmid pKLC102 [23]. This *orf* is overlapped with *tetR*, which belongs to the TetR family of transcriptional regulators involved in the transcriptional control of multidrug efflux pumps, pathways for the biosynthesis of antibiotics, response to osmotic stress and toxic chemicals, control of catabolic pathways, differentiation processes and pathogenicity [24]. Cassettes are preferentially integrated adjacent to the *attI* site, but recombination events do not always occur as predicted (for example because of unusual recombination between an *attI* site and an *attC* site), thus creating a potential fusion of two adjacent gene cassettes [25]. *orfJ* encodes a hypothetical protein with conserved domains belonging to the family pfam06977 and to the superfamily cl06158. These two families represent a conserved region ca. 100 residues long within a number of hypothetical bacterial proteins that may be regulated by SdiA, a member of the LuxR family of transcriptional regulators. *orfJ* is inserted in an inverted position with regard to the promoters, thus there may be no transcription of the putative protein.

The smallest amplicon present in strains PA110514 and PA116136 was an integron that lacked integrated gene cassettes

Table 2
Characteristics of integrons and their gene cassettes identified in the integron-carrying clinical isolates.

Isolate	Amplicon length (bp)	Integron	Cassette(s)	Protein encoded
Cc	1000	Inl8	<i>aadA7</i>	Aminoglycoside adenytransferase
Cd	1000	Inl9	<i>aadA7</i>	Aminoglycoside adenytransferase
28	1000	Inl28	<i>aadA7</i>	Aminoglycoside adenytransferase
7	740	Inl7	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
Cm	740	Inl13	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
Cn	740	Inl34	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
Co	740	Inl35	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
19	740	Inl19	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
22	740	Inl22	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
30	740	Inl30	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
B'	740	InB	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
33	750	Inl33	<i>aadB</i>	Aminoglycoside 2' O adenytransferase
69	750	Inl69	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
76	750	Inl76	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
77	750	Inl77	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
87	750	Inl87	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
93	750	Inl93	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
99	750	Inl99	<i>aadB</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase
cb	200	Inl2	No gene	–
17	200	Inl17	No gene	–
26	200	Inl26	No gene	–
P1	2500	InP1	<i>aadB</i> <i>orfE</i> <i>aadA11</i>	Aminoglycoside-2'-O-adenyltransferase Aminoglycoside-2'-adenyltransferase Aminoglycoside-3'-adenyltransferase
P18	2500	InP18	<i>orfL</i> <i>tetR</i> <i>orfJ</i>	Putative phage integrase TetR Putative protein, function unknown
P4	3000	InP4	<i>aac(6')-II</i> <i>bla_{P1b}</i> <i>aadA2</i>	Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase β-Lactamase Aminoglycoside-3'-O-adenyltransferase
PA110514	2500	In141	<i>orfL</i> <i>tetR</i> <i>orfJ</i>	Putative phage Integrase TetR Putative protein, function unknown
PA116136	400	In142	No gene	–
	2500	In361	<i>orfL</i> <i>tetR</i> <i>orfJ</i>	Putative phage integrase TetR Putative protein, function unknown
	400	In362	No gene	–

but contained 5'-CS and 3'-CS, like the one in strains cb, 17 and 26. These empty structures may represent a reservoir that could confer bacteria the capacity to adapt rapidly to the environment by means of the acquisition of antibiotic resistance genes, amongst others, thus allowing selective advantage. Alternatively, the lack of integrated genes cassettes may be a consequence of the excision of previously integrated cassettes from the integron when antibiotic selective pressure is diluted in the environment, thus integrons could be in contact with, and even be acquired by, any strain, but not retained when selective pressure disappears. Recently it has been demonstrated that the expression of gene cassettes is regulated by an SOS response control [26] and antibiotic resistance genes can be silenced at no biological cost until they are required. However, these 'empty' structures appear to be indicators of the absence of sustained antimicrobial pressure.

The integron carried by P4 (Fig. 1), designated InP4 from its gene content, included *aacA4*, also called *aac(6')-II* (aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase), downstream of the *attI1* recombination site,

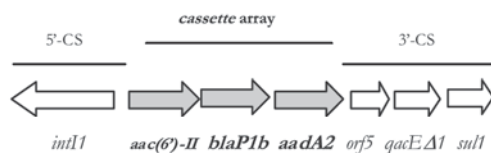


Fig. 1. Schematic representation of the cassette array contained in the variable region of the integron found in *Pseudomonas aeruginosa* P4. Inserted gene cassettes are indicated by grey arrows. The arrows show the direction of transcription of genes.

directly followed by the β-lactamase gene *bla_{P1b}* coding for PSE-1/CARB-2, and the adenytransferase gene *aadA2*. The AAC(6')-II family of enzymes provide resistance to tobramycin, netilmicin, kanamycin and gentamicin. AAC(6')-II is not only the most common AAC(6') but also the most common AAC in *P. aeruginosa* and is thus a significant determinant of gentamicin and tobramycin resistance in this organism. *bla_{P1b}* coding for PSE-1/CARB-2 carbenicillinase confers resistance to the β-lactams piperacillin, carbenicillin and ticarcillin. The last gene, *aadA2*, encodes for aminoglycoside-3'-O-adenyltransferase that confers resistance to streptomycin and spectinomycin. It has been argued that the common use of β-lactams and aminoglycosides for the clinical treatment of humans has contributed to the simultaneous presence of gene cassettes encoding β-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes in the same integron. Furthermore, the genes of this cassette, and also the complete cassette array, show high sequence identity (99%) with strains from distant countries such as China (*P. aeruginosa* strain PA466, GenBank accession no. FJ817423.1), Portugal (*P. aeruginosa* In99 and In100; GenBank accession nos. DQ219465.1 and AY560837.1 [27]) and Italy [28], amongst others.

The observation that geographically diverse *P. aeruginosa* strains have acquired the same or a highly similar cassette array suggests that contact with yet unidentified bacterial reservoirs contributes to the evolution of this pathogen towards multiresistance in Europe. This contribution is possibly by means of horizontal transfer of the complete integron structure. Antibiotics are used on a large scale in other ecological niches, for instance in animals for food production. In this context, these antibiotics may also contribute as sources or reservoirs of integrons carrying resistance genes [29].

Moreover, several studies have examined normal commensal microbiota from apparently healthy people, and high resistance rates to several antimicrobial agents have been observed. Thus, these bacteria could act as a reservoir for drug resistance genes recruited by pathogens under antibiotic pressure [30].

Integrations that contain gene cassettes provide a powerful vehicle for the rapid horizontal transfer of resistance across bacterial populations and thus could contribute to the sudden increase in the prevalence of multidrug-resistant infections in a community. The distribution of identical genes in organisms isolated from people living in disparate geographic regions indicates that they were more likely infected by organisms already harbouring such gene cassettes that originate in non-human reservoirs. That is, there appears to be a global 'epidemic' of mobile drug resistance genes, possibly spread by globalisation of trade.

The variety of structures found amongst class 1 integrons after more than half a century of antibiotic usage bears testament to the genetic flexibility and adaptability of the bacterial genome under environmental stress, characteristics that make these microorganisms ultimate survivors.

In conclusion, we propose that class 1 integrons are transient elements that foster antibiotic resistance in clinical environments, but not in the absence of antibiotic selective pressure. If this were the case, a decrease in antibiotic usage may lead to a significant reduction in the carriage of integrons amongst *P. aeruginosa* strains.

Acknowledgments

The authors thank the Servei de Microbiologia of the Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona, Spain) for generously providing the strains, and Prof. Dr R. Benz for critical reading of the manuscript.

Funding: This work was supported by BFU2006-12268/BFI from the Spanish Ministry of Science and Technology/FEDER (to MV).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- Chastre J, Fagon JV, Domart Y, Gibert C. Diagnosis of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8: 35–9.
- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 1999;27:887–92.
- Römling U, Fiedler B, Bosshammer J, Grothues D, Greipel J, von der Hardt H, et al. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1994;170:1616–21.
- Picard B, Denamur F, Barakat A, Elion J, Goulet P. Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. *J Med Microbiol* 1994;40:313–22.
- Ruiz L, Domínguez MA, Ruiz N, Viñas M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the hospital setting. *Arch Med Res* 2004;35:251–7.
- Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:666–72.
- Smith SP, Manges AR, Riley LW. Temporal changes in the prevalence of community-acquired antimicrobial-resistant urinary tract infection affected by *Escherichia coli* clonal group composition. *Clin Infect Dis* 2008;46:689–95.
- Solberg OD, Ajiboye RM, Riley LW. Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2006;44:1347–51.
- Márquez C, Labbate M, Raymondo C, Fernández J, Gestal AM, Holley M, et al. Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *J Clin Microbiol* 2008;46:3417–25.
- Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989;3:1669–83.
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:185–91.
- Recchia GD, Hall RM. Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pLE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the *incQ* plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* 1995;15:179–87.
- Severino P, Magalhães VD. Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:156–62.
- Post V, Recchia GD, Hall RM. Detection of gene cassettes in Tn402-like class 1 integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3467–8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 7th ed. Document M07-A7. Wayne, PA: CLSI; 2006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. Document M100-S18. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- Feliciello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 1993;212:394–401.
- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995;226:235–40.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–402.
- Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2947–9.
- Juntunen P, Heiska H, Olkkola S, Myllyniemi AL, Hänninen ML. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* selected by tylosin treatment at a pig farm. *Vet Microbiol* 2010;146:90–7.
- Llanes C, Neuwirth C, El Garch F, Hocquet D, Plésiat P. Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 β -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:270–8.
- Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tümmler B. Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa*. *C J Bacteriol* 2004;186:518–34.
- Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, et al. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:326–56.
- Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RM. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology* 2000;146:2855–64.
- Guerin E, Cambay G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Eriil I, Da Re S, et al. The SOS response controls integron recombination. *Science* 2009;324:1034.
- Quinteira S, Sousa JC, Peixe L. Characterization of *In100*, a new integron carrying a metallo- β -lactamase and a carbencillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:451–3.
- Giske CG, Iibisch B, Colinson C, Scoulica E, Pagani I, Füzi M, et al. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2006;44:4309–15.
- Ajiboye RM, Solberg OD, Lee BM, Raphael E, Debroy C, Riley LW. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clin Infect Dis* 2009;49:365–71.
- Nys S, Okeke IN, Kariuki S, Dinant GJ, Driessen C, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* from healthy volunteers from eight developing countries. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:952–5.

Carbapenem-resistance mechanisms of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Ester Fusté,¹ Lúdia López-Jiménez,¹ Concha Segura,² Eusebio Gainza,³ Teresa Vinuesa¹ and Miguel Viñas¹

Correspondence
Miguel Viñas
mvinyas@ub.edu

¹Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona-IDIBELL, Campus de Bellvitge, L'Hospitalet, Barcelona

²Laboratori de Referencia de Catalunya, Prat de Llobregat, Barcelona

³Praxis Pharmaceuticals, Vitoria, Spain

Clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA) is a major concern worldwide. The aim of this study was to explore the mechanisms leading to the carbapenem resistance of an MDRPA clone. Isolates were obtained from a surgical wound, sputum, urine and a blood culture. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) showed high genomic homogeneity of these isolates and confirmed the circulation of an endemic clone belonging to serotype O4. Outer membrane protein (OMP) bands were visualized by SDS-PAGE, meropenem accumulation was measured in a bioassay and integrons were detected by PCR. Efflux pumps were studied for several antimicrobial agents and synergic combinations thereof in the presence or absence of both carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) and Phe-Arg- β -naphthylamide (PA β N) at final concentrations of 10 and 40 mg l⁻¹, respectively. On OMP electrophoretic profiles, MDRPA showed a reduction of outer membrane porin D (OprD) and PCR demonstrated the presence of a class 1 integron with a cassette encoding aminoglycoside adenylyltransferase B (*aadB*). Meropenem accumulation was slightly higher in bacilli than in the filamentous cells that formed in the presence of antibiotics. Overexpression of the efflux pump MexAB-OprM and a functional MexXY-OprM were detected in all isolates.

Received 28 January 2013
Accepted 29 May 2013

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa frequently causes infections that develop in wound and burn patients and in the severe respiratory tract infections commonly seen in cystic fibrosis patients. In many countries, a major cause of concern is the increasing prevalence of infections caused by isolates of multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDRPA). Controlling the spread of MDRPA, enlarging the therapeutic arsenal used to fight these infections and reducing the mortality of infected individuals (Woodford *et al.*, 2011; Cabot *et al.*, 2012) are currently important goals of microbiological surveillance. However, a serious challenge to these efforts is that some of the classic antimicrobial drugs as well as

several of the newly available drugs are no longer effective against MDRPA since many strains are resistant (Kanj & Kanafani, 2011).

The high level of antibiotic resistance in *P. aeruginosa* involves several mechanisms, including the overexpression of active efflux systems, the production of modifying enzymes, a decrease in outer membrane (OM) permeability and structural alterations of topoisomerases II and IV, involved in quinolone resistance (Strateva & Yordanov, 2009).

Carbapenems such as meropenem and imipenem are potent broad-spectrum antimicrobial agents used to treat MDRPA infections. These antibiotics bind to critical penicillin-binding proteins, thereby disrupting growth and structural integrity of the bacterial cell wall. However, the resistance of non-fermenting Gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa*, to imipenem and meropenem is increasing (Nicolau, 2008). Among the mechanisms implicated in resistance are diminished cell-wall permeability, the overexpression of intrinsic efflux systems and the production of carbapenem-hydrolysing β -lactamases.

In *P. aeruginosa*, one of the main mechanisms of carbapenem resistance is a reduction of OM permeability

Abbreviations: AadB, aminoglycoside adenylyltransferase B; CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; EPI, efflux pump inhibitor; IVR, integron variable region; MDRPA, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; OM, outer membrane; OMP, outer membrane protein; OprD, outer membrane porin D; PA β N, Phe-Arg- β -naphthylamide; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the nucleotide sequences of class 1 integrons are JF714996.1, JF718319.1, JF727876.1 and JF742758.1.

through alterations in or decreased production of outer membrane porin D (OprD). This porin allows the cellular entry of carbapenems, and especially of imipenem (Farra *et al.*, 2008).

Imipenem has no effect on the shape of *P. aeruginosa* whereas meropenem induces alterations that give rise to filamentous cells. Previous *in vitro* studies showed that these morphological changes depend on the concentration of meropenem and the antibiotic exposure period (Trautmann *et al.*, 1998).

Hori *et al.* (1999) demonstrated that meropenem leads to the release of greater amounts of endotoxin than induced by other carbapenems. In *P. aeruginosa*, resistance to carbapenems, other β -lactam antibiotics and aminoglycosides is strongly related to the production of several enzymes, especially β -lactamases, carbenicillin hydrolysing β -lactamases, extended-spectrum β -lactamases (ESBL), class D β -lactamases (oxacillinases), metallo- β -lactamases (MBLs) carbapenemases and aminoglycoside-modifying enzymes (Strateva & Jordanov, 2009). In MDRPA, some of these antibiotic-resistance genes are clustered in a cassette carried by a class 1 integron (Llanes *et al.*, 2006). Nonetheless, mechanisms other than low OM permeability, β -lactamases and genetic elements are needed to explain the intrinsic and acquired resistance of *P. aeruginosa*. For example, the elevated expression of genes encoding multi-drug efflux pumps frequently produces high levels of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria (Nikaido, 1998). Studies with clinical isolates, including epidemic clones, support the role of these pumps in multidrug resistance (Morita *et al.*, 2012). Indeed, in *P. aeruginosa* ten such pumps (excluding metal cation transporters) belonging to the resistance–nodulation–division (RND) family have been identified (Woodford *et al.*, 2011; Falagas *et al.*, 2006). Accordingly, a new molecular approach to block efflux and thereby restore drug susceptibility in resistant clinical strains is via efflux pump inhibitors (EPIs). The recently discovered inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide (PA β N), which is highly effective against *P. aeruginosa* efflux mechanisms, reverses fluoroquinolone resistance and has potent broad-spectrum activity (Pagès *et al.*, 2005).

Given the multiple routes of bacterial resistance, the aim of the present study was to examine some of the resistance mechanisms used by MDRPA isolates derived from a clone endemic to our hospital.

METHODS

Bacteria, media, antibiotics and EPIs. MDRPA isolates 459, 133, 162 and 527 (serotype O4), belonging to a clone endemic to Hospital del Mar (Barcelona) and isolated, respectively, from sputum, a surgical wound, urine and a blood culture between 2005 and 2008 were used to explore mechanisms leading to carbapenem resistance. The clone was confirmed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of a *speI* DNA digest using the method described by Maslow *et al.* (1993), with some modifications. Strain *P. aeruginosa* ATCC 27853 served as the control in electrophoresis and in susceptibility testing.

Ceftazidime, ciprofloxacin, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) and Pa β N were purchased from Sigma Chemical Co. Meropenem was from Astra Zeneca UK Ltd, imipenem from Merck and tobramycin from Fagron Iberica. All bacteriological culture media were from Scharlab.

Drug susceptibility testing. Susceptibility to the antimicrobial agents was determined using the broth microdilution method in Mueller–Hinton broth, as recommended by the CLSI (CLSI, 2010), and expressed as MIC. The breakpoints were those recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2011).

OM isolation. OMs were isolated from 100 ml of stationary-phase cultures. Harvested bacteria were suspended in 30 ml of Ringer 1:4, centrifuged at 6000 g at room temperature for 15 min and suspended in 30 ml of 10 mM HEPES (pH 7.4). The suspended cells were disrupted at a pressure of 30 kPa (Constant Cell Disruption Systems) followed by sedimentation at 3000 g for 15 min at 21 °C to remove any remaining whole cells. Whole membranes were harvested by centrifugation at 60 000 g for 90 min at 21 °C. The pellet, containing the OMs, was suspended in 2 ml of 1% sodium lauryl sarcosinate in 10 mM HEPES (pH 7.4), incubated at room temperature for 20 min and centrifuged at 60 000 g for 60 min (Puig *et al.*, 1993).

Proteins contained in the resulting supernatant were resolved by SDS-PAGE following a modification of the Laemmli method (Laemmli, 1970). Sizes were determined using a molecular marker from Bio-Rad.

Bioassay of meropenem accumulation. Accumulation of the antibiotic was measured in a turbidimetric assay based on the method of Rodriguez *et al.* (2004), performed as follows: 1 day before the assay, 20 ml of Mueller–Hinton medium in a 20 mm \times 200 mm glass tube was inoculated with a loop of *E. coli* ATCC 25922 from a 24 h stock culture and incubated for 16–18 h at 37 °C. The inoculum was prepared by transferring 13 ml of this overnight culture to 1 l of assay broth. One millilitre of each working standard solution (concentrations range from 0.01 to 25 mg meropenem l⁻¹) and 1 ml of each sample dilution was inoculated into each of two sterile glass tubes. One to two tubes containing 1 ml of phosphate buffer pH 4.5 were included as controls. Two tubes containing 1 ml of a 7% phenol solution were used as blanks. Nine millilitres of inoculum was then added to each tube; they were then incubated in a water bath at 37 \pm 0.2 °C for 2–4 h. Bacterial growth was stopped by the addition of 1 ml of a 7% phenol solution. Absorbances at 550 nm were measured in tubes containing the highest to the lowest concentration of working solution. The sample dilution readings were then translated into the equivalent levels of the working standards. A standard curve was prepared of log absorbance versus concentration using the mean turbidity of each pair of tubes. Total protein was measured using the Pierce BCA protein assay kit (ThermoScientific).

Detection and analysis of class 1 integrons. DNA for integron detection was extracted using a modification of the method described by Lévesque *et al.* (1995). Briefly, 200 μ l of a bacterial culture grown in 4 ml of brain heart infusion/10% glycerol at 30 °C overnight was added to 800 μ l of distilled water and boiled for 10 min. The cell suspension was centrifuged at 12 000 g for 2 min, with the supernatant used for PCR analysis. PCR was performed in 100 μ l volumes containing 30 μ l of template DNA and 70 μ l of PCR mix [2.5 pmol oligonucleotides, 1 U *Taq* DNA polymerase, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, 3 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl (pH 8), 50 mM KCl, 0.001% gelatin, distilled water; Fermentas] and the appropriate primers (Invitrogen). The three-step reaction was performed in a thermal cycler as follows: 1 min of denaturation at 94 °C, 1 min of annealing at 55 °C and 5 min of extension at 72 °C for a total of 35 cycles. All completed reactions were maintained at

Table 1. MICs (mg l⁻¹) of ATCC 27853 and MDRPA strains determined by a microdilution method

Clinical breakpoints, according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2011): imipenem, susceptible ≤4 mg l⁻¹, resistant >8 mg l⁻¹; meropenem, susceptible ≤2 mg l⁻¹, resistant >8 mg l⁻¹; ciprofloxacin, susceptible ≤0.5 mg l⁻¹, resistant >1 mg l⁻¹; tobramycin, susceptible ≤4 mg l⁻¹, resistant >4 mg l⁻¹; ceftazidime, susceptible ≤8 mg l⁻¹, resistant >8 mg l⁻¹.

Strain		459	133	162	527	ATCC 27853
Drug	Family	MIC (mg l ⁻¹)				
Imipenem	Carbapenem	8	8	8	8	1
Meropenem	Carbapenem	8	8	8	8	2
Ciprofloxacin	Fluoroquinolone	64	64	64	64	0.5
Tobramycin	Aminoglycoside	32	64	64	64	0.5
Ceftazidime	Cephalosporin	128	64	64	64	4

4 °C. The PCR products were subjected to electrophoresis (85 V for 2 h) in a 0.7% agarose gel and then visualized by staining the gel with ethidium bromide.

DNA sequencing and submission. The MinElute PCR purification kit (Qiagen) was used to purify the PCR products representing integron variable regions (IVRs). The purified amplicons were sequenced using the ABI PRISM BigDye Terminator version 3.1 cycle sequencing ready reaction kit and the ABI PRISM 3700 DNA analyser (Applied Biosystems).

Sequences were compared using BLAST software, available online (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Efflux-pump-mediated fluoroquinolone resistance. To establish the prevalence of efflux-pump-mediated fluoroquinolone resistance in the MDRPA strains, MICs were determined in assays performed in 96-well microtitre plates. The twofold standard broth microdilution method, using Mueller–Hinton broth and carried out with or without a fixed concentration of the efflux inhibitor PAβN, was employed in these experiments (Kriengkauykiat *et al.*, 2005). Ciprofloxacin was tested at 11 concentrations (128–0.125 mg l⁻¹) and PAβN at 40 mg l⁻¹. A confirmation test was also performed.

To measure active efflux under different environmental conditions, parallel growth inhibition assays using the EPIs PAβN and CCCP were carried out according to Fenosa *et al.* (2009).

Detection of a functioning MexXY-OprM efflux pump. To detect the presence of a functioning MexXY-OprM efflux pump in the MDRPA strains, the MIC of the aminoglycoside tobramycin was determined in 96-well microtitre plates. The twofold standard broth microdilution method, using Mueller–Hinton broth, in the absence and presence of 40 mg l⁻¹ PAβN, was used (Mao *et al.*, 2001).

Effect of PAβN on antimicrobial activity. A checkerboard titration assay was carried out to assess the interaction of ceftazidime or meropenem with tobramycin (0–128 mg l⁻¹), alone and in combination with 40 mg l⁻¹ PAβN.

RESULTS

Drug susceptibility testing

MIC data for the ATCC 27853 and MDRPA isolates for several antimicrobial agents are shown in Table 1.

Electrophoresis of outer membrane proteins (OMPs)

Fig. 1 shows the electrophoretic profiles of OMPs from the MDRPA strains and from ATCC 27853. The only apparent difference was a relative reduction in the OprD (46 kDa) band in the MDRPA strains.

Bioassay of meropenem accumulation

In the presence of a high meropenem concentration (4 × MIC), the normally coccobacillic *P. aeruginosa* was able to survive as long undivided filaments. When antibiotic pressure was withdrawn, the cells returned to their original shape (Fig. 2). Meropenem accumulation was 15% higher in the normal cells than in the filamentous cells.

Detection of class 1 integrons

Amplifications from all MDRPA endemic clones yielded a 750 bp PCR product (Fig. 3a). The class 1 integrons mapped

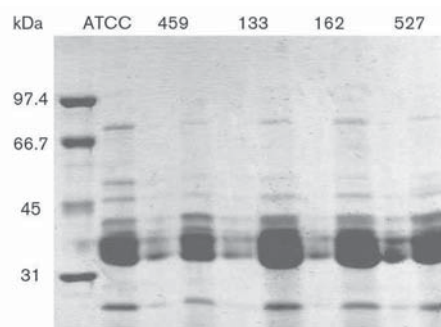


Fig 1. SDS-PAGE of OMPs of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and MDRPA strains. Positions of molecular mass standards are shown on the left.

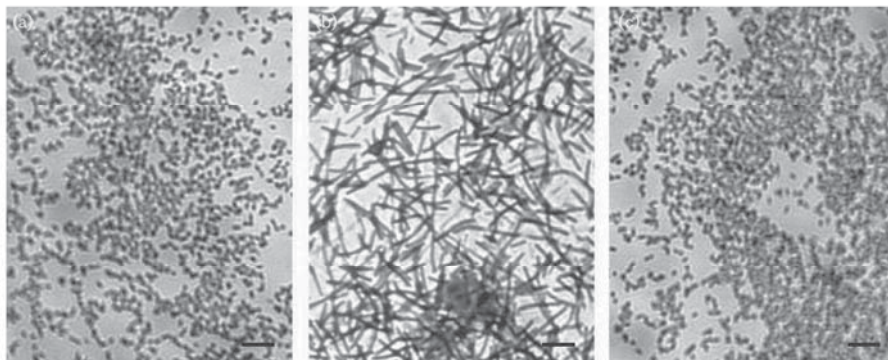


Fig. 2. Effects of a high-concentration of meropenem on *P. aeruginosa* cell shape. (a) *P. aeruginosa* rods grown without antibiotic. (b) *P. aeruginosa* rods grown with 4× MIC of meropenem. (c) *P. aeruginosa* rods after removal of antibiotic pressure. Scale bar, 10 µm.

from these strains were identical and carried only one resistance gene, for aminoglycoside adenylyltransferase B [*aadB*, also called *ant(2'')-Ia*], contained in a cassette. The enzyme encoded by this gene is involved in aminoglycoside resistance (Fig. 3b), specifically to gentamicin, kanamycin and tobramycin.

Efflux-pump-mediated fluoroquinolone resistance

All MDRPA strains had a ciprofloxacin MIC of 64 mg l⁻¹ and were thus interpreted as resistant. The efflux pump overexpression phenotype was defined based on at least a twofold decrease in the ciprofloxacin MIC when determined in the presence of PAβN and was observed in all MDRPA strains (Fig. 4).

In the presence of PAβN (40 mg l⁻¹), efflux inhibition was detected for all of the tested antibiotics except tobramycin, a PAβN antagonist. By contrast, CCCP (10 mg l⁻¹ concentration), despite its apparent efflux-inhibiting activity, caused bacterial death, even in the absence of antibiotics, indicating its toxicity for *P. aeruginosa* (Fig. 5a, b).

Detection of a functioning MexXY-OprM efflux pump

Although all of the MDRPA strains had a high tobramycin MIC, in the presence of 40 mg l⁻¹ PAβN their sensitivity to this antibiotic increased, as evidenced by a significant increase in the MIC (Fig. 6).

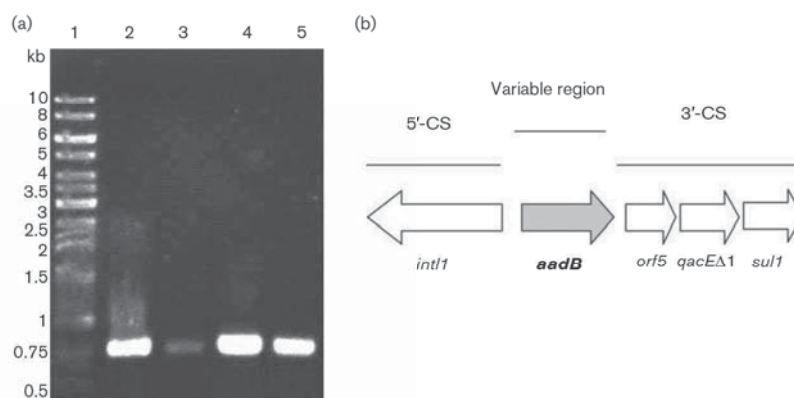


Fig. 3. (a) PCR amplification, using the 5'-CS and 3'-CS primers, of variable regions of integrons from MDRPA isolates. The PCR products were separated by electrophoresis in 0.7% agarose. Lane 1, 1 kb DNA ladder; lane 2, *P. aeruginosa* 459; lane 3, *P. aeruginosa* 162; lane 4, *P. aeruginosa* 527; lane 5, *P. aeruginosa* 133. (b) Schematic representation of a class 1 integron with an *aadB* gene cassette; arrows show direction of transcription of genes.

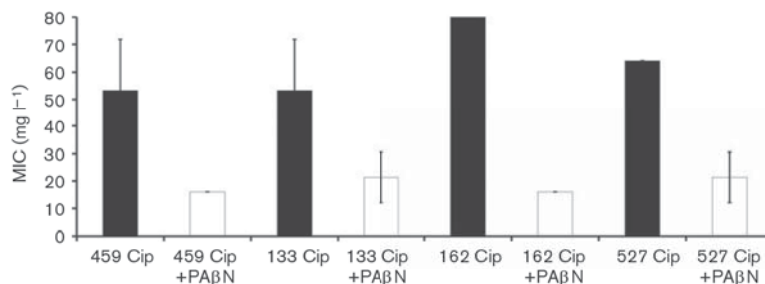


Fig. 4. Effects of inhibition of efflux by the EPI PAβN on ciprofloxacin susceptibility; all the strains were tested over the same range of ciprofloxacin concentrations (0.125–128 mg l⁻¹) with and without PAβN, and showed significant decreases in MIC with the EPI. Error bars indicate SD of three experiments.

Effect of PAβN on antimicrobial activity

The addition of PAβN resulted in only negligible reductions in the ceftazidime and meropenem MICs, in contrast to the antagonistic effects of tobramycin and ceftazidime or tobramycin and meropenem regardless of the β-lactam concentration (Table 2).

DISCUSSION

The *P. aeruginosa* strains examined in this study were resistant to all of the antimicrobials tested (Table 1), including carbapenems, and were therefore considered as MDRPA, i.e. resistant to at least three different classes of

antimicrobial agents, mainly aminoglycosides, carbapenems, antipseudomonal penicillins, quinolones and cephalosporins (Falagas *et al.*, 2006). The increasing emergence of MDRPA strains is a cause for concern as it compromises the therapeutic options for treating infections with these bacteria. At the same time, it highlights the importance of developing alternative approaches, such as the use of drug combinations or EPIs, and of identifying novel antipseudomonal agents (Lomovskaya & Watkins, 2001).

The homogeneity of the PFGE profiles of the tested isolates confirmed the existence of an endemic *P. aeruginosa* clone in our hospital. A similar scenario was described by Koutsogiannou *et al.* (2013), who also reported the clonal

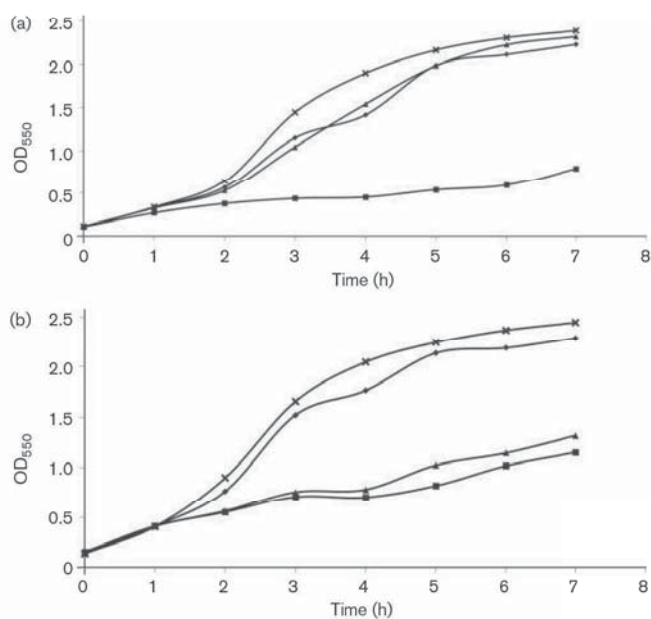


Fig. 5. (a) Growth inhibition assay of an MDRPA using PAβN as an EPI. (b). Growth inhibition assay of an MDRPA using CCCP as an EPI. ◆, ciprofloxacin; ■, ciprofloxacin plus EPI; ▲, EPI alone; ×, *P. aeruginosa* without antibiotic or EPI. Data presented are representative of those obtained from three independent assays performed on three independent cultures.

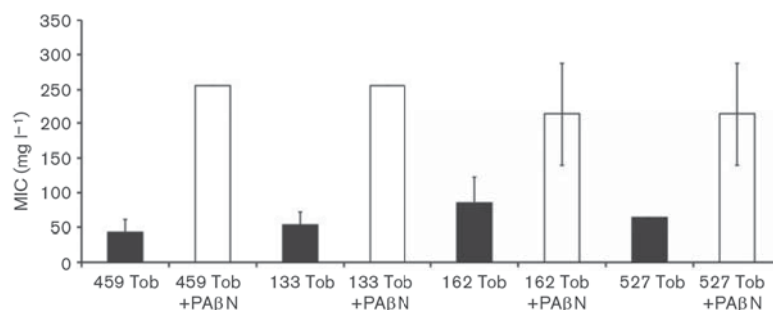


Fig. 6. Effects of the efflux pump inhibitor PA β N on tobramycin susceptibility; all the strains were tested over the same range of tobramycin concentrations (0.25–256 mg l⁻¹), and showed antagonism with PABN (40 mg l⁻¹). Error bars indicate SD of three experiments.

dissemination of MDRPA in a university hospital. Indeed, the inter-hospital spread of MDRPA clones in Spanish hospitals other than ours was recently determined, emphasizing the need for measures to prevent the clinical dissemination of these isolates (Cabot *et al.*, 2012).

We observed that the survival of *P. aeruginosa* in the presence of high concentrations of meropenem (4 \times MIC) coincided with a change in its shape, to long undivided filaments. When antibiotic pressure was withdrawn the bacteria returned to their normal shape. According to these findings, meropenem accumulation in *P. aeruginosa* seems to differ depending on cell shape. Both Trautman *et al.* (1998) and Horii *et al.* (1999) described the meropenem-related induction of filamentous forms in *P. aeruginosa* and suggested that these morphological changes depended on

the length of exposure to the antibiotic and on the growth phase. Several studies have focused on the relationship between morphology and the amount of endotoxin released by *P. aeruginosa* exposed to carbapenems, but none has examined meropenem accumulation as a function of bacterial morphology. The bioassay used in this study, designed to measure meropenem accumulation, was able to detect small differences in antibiotic concentrations, which allowed us to identify the slightly greater accumulation of meropenem in normally shaped bacilli than in those that became filamentous in the presence of an antibiotic concentration fourfold higher than the MIC. However a more precise interpretation of these data awaits further studies. Meropenem has a high affinity for penicillin-binding protein 3, a bacterial protein involved in the final steps of cell-wall synthesis. During bacterial

Table 2. MICs of synergic combinations of antibiotic with and without PA β N

Meropenem and ceftazidime were tested at concentrations between 0.125 and 256 mg l⁻¹.

Fixed concentration tobramycin (mg l ⁻¹)	Pa β N (mg l ⁻¹)	Meropenem MIC (mg l ⁻¹)				Ceftazidime MIC (mg l ⁻¹)			
		Strain				Strain			
		459	133	162	527	459	133	162	527
0	0	8	8	8	8	128	64	64	64
0	40	4	8	4	4	32	32	32	32
8	0	0.5	1	1	1	4	2	4	4
8	40	8	8	8	16	32	32	64	32
16	0	0.125	0.5	0.25	0.5	0.125	0.5	1	1
16	40	8	8	8	8	32	32	32	32
32	0	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
32	40	8	8	8	8	8	32	32	32
64	0	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
64	40	8	8	8	16	16	32	32	16
128	0	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
128	40	8	4	8	8	16	32	32	16

division, the inhibition of penicillin-binding protein 3 prevents the separation of daughter bacteria (Weiss *et al.*, 1999) and leads to the formation of long filaments. These altered cells have a non-functional penicillin-binding protein 3 but are able to survive for relatively long periods, and under appropriate conditions resume their original morphotype. Thus, morphological changes may at least partially explain the failure of antibiotic treatments in infected patients, since exposed cells can survive as long rods and serve as the origin of recidivisms when their 'normal' morphology is restored.

The reduction of OprD seen in all MDRPA isolates compared to the wild-type strain (ATCC 27853) may also account for the decreased susceptibility of the isolates to imipenem and meropenem. However, *in vivo* quantitative determinations of the actual role of the OM and porins in the presence of antibiotics are difficult, since both the physiological state of a bacterium and OMP expression depend strongly on the environmental conditions. Studies have reported that downregulation of the *oprD* gene and inactivation of the OprD protein contribute, respectively, to imipenem resistance and to a reduction in meropenem susceptibility (Veiga-Crespo *et al.*, 2011; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). In view of these studies, intermediate susceptibility or resistance to imipenem can be ascribed to OprD inactivation alone whereas more complex mechanisms apparently underlie meropenem resistance, including the overexpression of AmpC and of several efflux pumps. Meropenem activity is clearly affected by two of these pumps, MexAB-OprM and MexXY-OprM (Poole, 2004). Ikonomidis *et al.* (2008) found that in populations of *P. aeruginosa* exhibiting carbapenem heterogeneity, efflux is upregulated following an increase in *mexB* and *mexY* gene transcripts and reduced expression of OprD (46 kDa). We found that these heterogeneous strains also produce the oxacillin-hydrolysing enzymes OXA-1 and OXA-2, which contribute to carbapenem resistance (unpublished data).

Based on our experiments using the inhibitor PA β N, the phenotype of the MDRPA isolates was found to include both the overexpression of MexAB-OprM and a functioning MexXY-OprM efflux pump. However, the unexpected results obtained with CCCP rule out the use of this inhibitor in studies of *P. aeruginosa* and thus perhaps in other strictly respiratory bacteria. Both structural changes in target enzymes and active efflux are relevant mechanisms leading to fluoroquinolone resistance in *P. aeruginosa* (Nakajima *et al.*, 2002). Similarly, MexXY-OprM overexpression has been related to carbapenem resistance. Mao *et al.* (2001) reported that PA β N antagonizes aminoglycoside activity only in strains containing a functioning MexXY-OprM, with antagonism greater in strains expressing high levels of this efflux pump. The negligible reductions in the meropenem and ceftazidime MICs of our MDRPA strains in the presence of PA β N is understandable because MexAB is an efficient pump for both antibiotics (Drusano *et al.*, 2009).

Many reports have suggested the convenience of 'rescuing' traditional antibiotics to devise synergistic combinations of antimicrobials that could be used to treat infections by multidrug-resistant micro-organisms. Although combinations of tobramycin and either ceftazidime or meropenem were shown to be synergistic (Blumer *et al.*, 2005), their efficacy in our MDRPA strains with respect to efflux pump overexpression could not be determined because of the remarkable antagonism of tobramycin by PA β N irrespective of the antibiotic concentration.

Furthermore, we found two mutations in the studied strains, one in *parC* and the other in *gyrA* (unpublished data). These results correlate with the observation that quinolone resistance in *Enterobacteriaceae* is generally caused by a cooperative effect between mutations in the *gyrA* and *parC* genes and efflux pumps, mostly *acrAB* (Ikonomidis *et al.*, 2008).

Nonetheless, *P. aeruginosa* resistance is complicated since many mechanisms are involved, including integrons and gene cassettes. Class 1 integrons are a common presence in MDRPA, since among all isolates reported thus far those resistant to less than three agents are *intI1*-negative, whereas isolates resistant to more than two agents are *intI1*-positive (Nemec *et al.*, 2010). All of our MDRPA strains had a class 1 integron containing the gene cassette array *aadB*, associated with resistance to kanamycin, gentamicin and tobramycin (Azucena & Mobashery, 2001). This type of integron was found previously in some clinical *P. aeruginosa* strains obtained from Bellvitge Hospital, Barcelona, and studied in our laboratory (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). However, this integron has been described not only in Spain but also in hospitals in Iran, where among MDRPA isolates from five hospitals 78% had an integron containing *aadB*. Amplifications of the IVRs of class 1 integrons from these isolates confirmed the high prevalence of class 1 integrons with a limited diversity of gene cassette arrays, including *aadB*, *aadA6-orfD* and *blaOXA10-aacA4* (Shahcheraghi *et al.*, 2010).

Syrms *et al.* (2008) also determined a high prevalence of the class 1 integron-associated *aadB* gene cassette in *P. aeruginosa*, isolated from a population of cystic fibrosis patients in Australia. However, some of the strains carrying the *aadB* gene were nonetheless tobramycin sensitive. Thus, the position of the *aadB* gene alone does not confer tobramycin resistance. In Brazil, 106 *P. aeruginosa* clinical isolates were analysed and none of the class 1 integrons detected included the *aadB* gene cassette (Fonseca *et al.*, 2005). Other studies showed that some class 1 integrons with more than one resistance gene also contained *aadB*. For instance, many MDRPA isolates (serotype O4) from various hospitals in the Czech Republic and Hungary shared an IVR with the gene cassette array *aadB-aadA13*, suggesting recent international dissemination. In China and Iran, several *P. aeruginosa* clinical isolates carried the *aadB* gene cassette array (Nemec *et al.*, 2010; Shahcheraghi *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2009).

Although integron-associated gene cassettes harboured by *P. aeruginosa* can vary among different geographical locations (Syrmis *et al.*, 2008), the clonal dissemination of MDRPA strains remains an important problem, with effective measures required to prevent their transmission. Multidrug-resistant bacteria serve as hosts not only of integrons but also of other genetic elements, such as transposons and plasmids, involved in the development of antibiotic-resistance phenotypes. Consequently, bacteria containing these elements are extremely effective vehicles for their broad dissemination (Woodford *et al.*, 2011).

ACKNOWLEDGEMENTS

Dedicated to Professor Miguel Regué *in memoriam*. E.F. was the recipient of an IDIBELL pre-doctoral fellowship. This work was partially supported by the Spanish Ministerio Economía y Competitividad/FEDER project IPT-2011-1402-900000.

REFERENCES

- Azucena, E. & Mobashery, S. (2001). Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist Updat* 4, 106–117.
- Blumer, J. L., Saiman, L., Konstan, M. W. & Melnick, D. (2005). The efficacy and safety of meropenem and tobramycin vs ceftazidime and tobramycin in the treatment of acute pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Chest* 128, 2336–2346.
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Gago, J. F., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C. & other authors (2012). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 6349–6357.
- Chen, J., Su, Z., Liu, Y., Wang, S., Dai, X., Li, Y., Peng, S., Shao, Q., Zhang, H. & other authors (2009). Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhejiang, China. *Int J Infect Dis* 13, 717–721.
- CLSI (2010). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 20th Informational Supplement M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Drusano, G. L., Liu, W., Fregeau, C., Kulawy, R. & Louie, A. (2009). Differing effects of combination chemotherapy with meropenem and tobramycin on cell kill and suppression of resistance of wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its isogenic MexAB efflux pump-overexpressed mutant. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2266–2273.
- EUCAST (2011). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website. <http://www.eucast.org>
- Falagas, M. E., Koletsi, P. K. & Bliziotis, I. A. (2006). The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 55, 1619–1629.
- Farra, A., Islam, S., Strålfors, A., Sörberg, M. & Wretling, B. (2008). Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Int J Antimicrob Agents* 31, 427–433.
- Fenosa, A., Fusté, E., Ruiz, L., Veiga-Crespo, P., Vinuesa, T., Guallar, V., Villa, T. G. & Viñas, M. (2009). Role of TolC in *Klebsiella oxytoca* resistance to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 63, 668–674.
- Fonseca, E. L., Vieira, V. V., Cipriano, R. & Vicente, A. C. (2005). Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44, 303–309.
- Horii, T., Ichiyama, S., Ohta, M. & Kobayashi, M. (1999). Relationship between morphological changes and endotoxin release induced by carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 48, 309–315.
- Ikonomidis, A., Tsakris, A., Kantzanou, M., Spanakis, N., Maniatis, A. N. & Pournaras, S. (2008). Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 279, 36–39.
- Kanj, S. S. & Kanafani, Z. A. (2011). Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc* 86, 250–259.
- Koutsogiannou, M., Drougka, E., Liakopoulos, A., Jelastopulu, E., Petinaki, E., Anastassiou, E. D., Spiliopoulou, I. & Christofidou, M. (2013). Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. *J Clin Microbiol* 51, 665–668.
- Kriengkauykiat, J., Porter, E., Lomovskaya, O. & Wong-Beringer, A. (2005). Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 565–570.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C. & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 185–191.
- Llanes, C., Neuwirth, C., El Garch, F., Hocquet, D. & Plésiat, P. (2006). Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect* 12, 270–278.
- Lomovskaya, O. & Watkins, W. (2001). Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 225–236.
- Mao, W., Warren, M. S., Lee, A., Mistry, A. & Lomovskaya, O. (2001). MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2001–2007.
- Maslow, J. N., Slutsky, A. M. & Arbeit, R. D. (1993). Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, pp. 563–572. Edited by D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover & T. J. White. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Morita, Y., Tomida, J. & Kawamura, Y. (2012). MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 3, 408.
- Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H. & Nakae, T. (2002). High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol Immunol* 46, 391–395.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M. & Musilek, M. (2010). Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol* 161, 234–242.
- Nicolau, D. P. (2008). Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother* 9, 23–37.
- Nikaido, H. (1998). Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 27 (Suppl 1), S32–S41.

- Pagès, J. M., Masi, M. & Barbe, J. (2005). Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med* **11**, 382–389.
- Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**, 12–26.
- Puig, M., Fusté, C. & Viñas, M. (1993). Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* **39**, 108–111.
- Rodríguez, N., Roig, S., Olmedo, N., Lorén, J. G. & Rius, N. (2004). A new bioassay method for quantitative analysis of tetracyclines. *J Ind Microbiol Biotechnol* **31**, 379–383.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L. & Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4783–4788.
- Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., Fusté, E., Vinuesa, T., Martínez, J. P. & Viñas, M. (2011). Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **38**, 398–402.
- Shahcheraghi, F., Badmasti, F. & Feizabadi, M. M. (2010). Molecular characterization of class 1 integrons in MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical settings in Iran, Tehran. *FEMS Immunol Med Microbiol* **58**, 421–425.
- Strateva, T. & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* **58**, 1133–1148.
- Syrmis, M., Bell, S., Bye, P., Coulter, C., Harbour, C., Iredell, J., Kidd, T., O'Carroll, M., Rose, B. & other authors (2008). High prevalence of a class 1 integron-associated *aadB* gene cassette in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an Australian cystic fibrosis patient population. *Pathology* **40**, 524–525.
- Trautmann, M., Heinemann, M., Zick, R., Möricke, A., Seidelmann, M. & Berger, D. (1998). Antibacterial activity of meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*, including antibiotic-induced morphological changes and endotoxin-liberating effects. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**, 754–760.
- Veiga-Crespo, P., Fusté, E., Vinuesa, T., Viñas, M. & Villa, T. G. (2011). Synergism between outer membrane proteins and antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2206–2211.
- Weiss, D. S., Chen, J. C., Ghigo, J. M., Boyd, D. & Beckwith, J. (1999). Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. *J Bacteriol* **181**, 508–520.
- Woodford, N., Turton, J. F. & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 736–755.

Bacterial adhesion efficiency on implant abutments: A comparative study

Marina Etxeberria,^{1,2} Lidia López-Jiménez,¹ Alexandra Merlos,¹ Tomás Escuín,²
Miguel Viñas^{1*}

¹Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ²Laboratory of Prosthodontics, Department of Dentistry, Medical and Dentistry Schools, University of Barcelona, IDIBELL, Barcelona, Spain

Received 28 October 2013 · Accepted 5 December 2013

Summary. The attachment of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 28213 onto six different materials used to manufacture dental implant abutments was quantitatively determined after 2 and 24 h of contact between the materials and the bacterial cultures. The materials were topographically characterized and their wettability determined, with both parameters subsequently related to bacterial adhesion. Atomic force microscopy, interferometry, and contact angle measurement were used to characterize the materials' surfaces. The results showed that neither roughness nor nano-roughness greatly influenced bacterial attachment whereas wettability strongly correlated with adhesion. After 2 h the degree of *E. coli* attachment markedly differed depending on the material whereas similar differences were not observed for *S. aureus*, which yielded consistently higher counts of adhered cells. Nevertheless, after 24 h the adhesion of the two species to the different test materials no longer significantly differed, although on all surfaces the numbers of finally adhered *E. coli* were higher than those of *S. aureus*. [Int Microbiol 2013; 16(4):235-242]

Keywords: implant abutments · glass fiber · bacterial adhesion · nano-roughness · wettability · biomaterials

Introduction

Bacteria can grow as sessile forms (biofilms) on almost all surfaces and under almost any environmental condition. In most infectious diseases, particularly those arising from infected implants and medical devices, bacterial growth as biofilms plays

a crucial role in disease pathogenesis [6]. Among all known biofilms occurring in pathologic settings, those in the oral cavity provide a good model system and as such have been extensively studied [13]. Oral biofilms are formed by a wide variety of gram-positive and gram-negative bacteria species and are a consistent feature of oral infections, mainly caries, periodontitis, and endodontitis, but they are also involved in infection-related implant failures, so-called peri-implantitis [23]. The adhesion and development of microbial biofilms depend upon the characteristics of the microbes that form them, but also on the environmental conditions. Chemical and surface properties such as roughness, nano-roughness, and wettability are relevant in controlling bacterial adhesion [28].

*Corresponding author: M. Viñas
Laboratory de Microbiologia Molecular
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona
Feixa Llarga s/n
08907 Hospitalet de Llobregat, Spain
Tel. +34-934024265
E-mail: mvinyas@ub.edu

One of the main goals of oral implantology is to significantly reduce the risk of infection, e.g., by altering the local environment such that it is less favorable for bacterial biofilm formation. Accordingly, the elucidation of the mechanisms underlying bacterial adhesion, colonization, and biofilm development on prosthetic devices and implant surfaces is currently an area of great interest in both clinical and biomedical research. From a biomechanical engineering standpoint, the physical properties of implant surfaces can be optimized by taking advantage of recent progress in both materials science and nanotechnology. By modulating cell-substrate interactions, for example, the biological response of the infectious agent can be determined [2,23,27].

The effect of surface topography on cell attachment has received significant attention, with several recently published studies highlighting the critical role in cellular adherence played by nanotopography [19,20,22]. Nano-engineered surfaces can directly influence bacterial behavior, as shown in studies demonstrating that these cells align in the anisotropic direction of microscale ridges and grooves [14]. Based on these findings, a possible approach to restrict biofilm formation involves the use of materials whose surface properties hinder biofilm development, particularly in the early stages of implantation [13]. Different strategies can be adopted to achieve this purpose, such as by altering the nanoscale surface topography. However, there is no consensus regarding whether increased surface roughness correlates either positively or negatively with the extent of bacterial attachment. Clearly, materials enhancing biofilm formation should be discarded even if they have excellent mechanical properties.

Metals, ceramics, polymers, and composites are currently used to manufacture prosthetic implant abutments. Among these materials, glass fiber-reinforced composites (glass-FRC) are a promising low-cost alternative to metal alloys, metal ceramics, and ceramic restorations. Indeed, in the last few years glass-FRCs have been used successfully in a variety of dental applications [1,10]. Implant-supported fixed prostheses of glass-FRC may also offer a suitable alternative [5,11], but the potential and limitations of this promising material have not been adequately evaluated.

A few studies have specifically examined the effect of the nanoscale morphology of dental implant abutment materials, and especially titanium, on surface-bacteria interactions *in vitro*. However, little is known about the extent of bacterial attachment on nanometrically characterized implant abutment surfaces, whether of titanium or other metals. Experimental approaches to explore topography with respect to bacterial adhesion include experimental bacteriology, atomic force microscopy (AFM), interferometry, and wettability measure-

ments. In this study, we analyzed and compared the surface properties, roughness, and wettability of six test materials used in the manufacture of implant abutments in terms of the adhesion of the gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Our aim was to evaluate the biocompatibility of glass-FRC and the potential application of this material in dentistry.

Materials and methods

Dental materials. Disks 10 mm in diameter and 2 mm thick were manufactured from each of six different implant abutment materials. The tested materials were: (i) Cast cobalt-chromium disks obtained from acrylic resin patterns (Pattern Resin LS, GC Corp.) and invested with phosphate-bonded investment material (CM-20 Cendrex+Métaux, Biel/Bienne, Switzerland) as indicated by the manufacturer (BEGO, Bremer Goldschlägerei Wilh. Herbst, Bremen, Germany). Casting was accomplished using Co-Cr Wirobond C alloy (BEGO). After melting and casting by induction (Ducatron Série 3 UGIN[®] Dentaire, Seyssins, France), the disks were sandblasted with 110- μ m aluminum oxide particles (Korox, BEGO) under 3 bar pressure to remove oxide films and residual investment. (ii) Selective laser melted (SLM) Co-Cr disks (BEGO). Both the cast and the SLM Co-Cr disks were polished in three stages: (a) using a hard rubber disk at 15,000 rpm; (b) then with a soft rubber disk at 15,000 rpm, and (c) using a soft brush with a polishing paste at 1400 rpm. Each polishing phase lasted 90 s. (iii) Machined and polished titanium grade V disks (Klockner-Soadco, Andorra). (iv) Zirconia (Y-TZP) disks (Dentisel, Barcelona, Spain). (v) Glass-FRC disks, prepared from rods (Bioloen, Saronno, Varese, Italy). And (vi) polyetheretherketone (PEEK) disks, prepared from rods (Teknimplant, Barcelona, Spain). All disks were handled by their lateral walls. They were gently cleaned using a cotton pellet with ethanol and dried under warm dry air.

Surface characterization. The disk surfaces were analyzed by three different methods: (i) Atomic force microscopy. It was carried out with an AFM XE-70 (Park Systems, Korea) in non-contact mode. The rectangular-shaped cantilever (ACTA Si-cantilevers, Park Systems) had a force constant of 40 N/m, a resonance frequency of 300 kHz, and a tip radius with a curvature of <10 nm. All AFM variables, including scan rate and set point, were optimized for the type of sample measured. Scan areas were 5 \times 5 μ m², with a scan rate of 0.6 Hz and a resolution of 256 \times 256 pixels. AFM images were processed using a scanning probe image processor XEI (Park Systems), correcting the plane of the AFM image for possible coupling of the lateral plane and the z-axis, caused by the instrument. The height, area, and volume of the surfaces were determined via polygon/ellipse/circle methods, in which a suitable shape is best fitted to the image. The average surface roughness (Ra) was calculated. (ii) White light interferometry; the specimens were visualized on a white light interferometer microscope (LeicaSCAN DCM3D, Leica Microsystems, Switzerland), which is a computerized optical interference microscope operating in the vertical scanning interferometry mode and producing a topographic image. The objective used was Leica N Plan H 50 \times /0.50, with an Mirau-interferometer objective lens and an image resolution of 250.64 \times 190.90 μ m². Images were analyzed using the software Leica map DCM 3D 6.2.6561 version (Leica Microsystems); the threshold was set to 1.0% and the Gauss filter to 25 μ m. Ra was determined. And (iii) surface wettability measurements; they were conducted by measuring the contact angle using the sessile water-drop method [13,24]. Briefly, 10 μ l of MilliQ-quality water was dropped onto the center of each specimen using an injector. Digital photo-

Table 1. Bacterial adhesion expressed as colony-forming units (CFU)/mm² (average of 16 determinations). SLM, selective laser melted; PEEK polyetheretherketone

Material	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	CFU/mm ² (2 h)	CFU/mm ² (24 h)	CFU/mm ² (2 h)	CFU/mm ² (24 h)
Cast Co-Cr	1.82×10^2	7.74×10^4	6.38×10^1	4.46×10^6
SLM Co-Cr	1.14×10^2	6.38×10^4	4.56	4.92×10^6
Titanium	1.18×10^2	6.83×10^4	1.41×10^1	7.84×10^6
Zirconia	3.42×10^2	3.37×10^5	1.00×10^1	4.92×10^6
GF-reinforced composite	2.64×10^2	4.15×10^5	2.73×10^2	4.24×10^6
PEEK	1.00×10^2	5.92×10^4	2.51×10^2	5.65×10^6

graphs were taken (Nikon D70) and the resulting images were analyzed using IMAT software (CCIT, Barcelona, Spain). Sixteen samples were measured in each group, with each disk measured twice.

Bacterial strains and culture media. Two collection bacterial strains were used to assess the adhesion properties of gram-negative and gram-positive bacteria on the test materials: *Escherichia coli* strain ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* strain ATCC 28213, respectively. Both strains were maintained on trypticase soy agar (TSA, Scharlau, Barcelona, Spain) plates. Adhesion experiments were carried out using two colonies selected from the plates to inoculate trypticase soy broth (TSB, Scharlau). The cultures were incubated at 37 °C in a rotary shaker at 240 rpm in air for 18 h, at which time they had reached the late exponential phase of growth.

Adhesion experiments. Disks to be used in the bacterial assays were sterilized in an autoclave (121 °C, 15 min). The above-described overnight cultures were diluted in TSB to the desired concentration (10^6 colony forming units [CFU]/ml in TSB), as determined spectrophotometrically. For the adhesion experiment, the disks were covered with a suspension of the bacterial culture and incubated at 37 °C with gentle (60 rpm.) shaking. samples were taken 2 and 24 h later, processing the disks by washing them four times in Ringer's 1/4 to remove unattached bacteria and then placing them in test tubes containing 1 ml of Ringer's 1/4. The tubes were submerged in an ultra-

sonic water bath for 3 min, vigorously vortexed for 1 min, and then treated ultrasonically again for 3 min to release the surface-attached bacteria. Serial dilutions (10^9 to 10^{-7}) of these suspensions were used to inoculate agar plates, which were incubated for 48 h. Colonies were then scored and counted. The detachment of biofilm-forming bacteria from the disks was monitored by microscopic visualization of the disks after sonication and vortexing.

Atomic force microscopy imaging. Bacteria were cultured in liquid media in which disks of tested materials were submerged; disks were then washed four-fold by using Ringer's 1/4 and allowed to dry on air. Samples were imaged in air by using an atomic force microscope XE-70 [Park Systems]. All images were collected in non-contact mode by using rectangular-shaped silicon cantilevers with a spring constant of ± 40 N/m and a resonance frequency of ± 300 kHz. The upper surface of these cantilevers (the opposite side of the tip) is coated with aluminium to enhance the laser beam reflectivity. The data acquired during the surface scanning were converted into images of topography, amplitude and phase; and analysed by using XEP and XEI software (Park Systems). On topography images, it becomes possible to observe the shape, structure and differences of the sample surface, amplitude images accentuating the edges gives roughness and height information. Finally, the phase images show variations in elasticity and viscoelasticity of the sample. The four types of image were simultaneously acquired with scan size of $25 \mu\text{m}^2$ at a scan rate of 0.6 Hz.

Table 2. Roughness values as determined by interferometry and atomic force microscopy. SLM, selective laser melted; PEEK, polyetheretherketone

Material	Roughness	Nanoroughness
	White light interferometry	Atomic force interferometry
	Ra (μm)	Ra (nm)
Cast Co-Cr	0.0776	48
SLM Co-Cr	0.0388	14
Titanium	0.0474	29
Zirconia	0.108	136
GF-reinforced composite	0.553	236
PEEK	0.113	59

Results

Bacterial adhesion of gram-positive *S. aureus* and gram-negative *E. coli* onto disks of the tested materials were compared. The results are summarized in Table 1. Surface roughness, determined as the mean arithmetic surface roughness (Ra), was characterized by interferometry and AFM, as shown in Table 2. The angles formed between water and the test materials resulted to be as follows: the lowest angle (75° 64') was formed on zirconia, followed by cast Co-Cr (79° 71'); three of

the tested materials gave quite similar angles: SLM Co-Cr (85° 4'), Titanium (84° 23') and PEEK (89° 75'), whereas the highest value corresponded to GF-reinforced composite (113° 36'). A set of selected images showing the surface roughness are presented for comparison in Fig. 1 (interferometry) and Fig. 2 (AFM).

Imaging of bacterial cells grown as sessile forms onto the different tested material surfaces allowed to distinguish details concerning adhesion and morphologies. Fig. 3 shows two AFM images of both *E. coli* and *S. aureus* when developing biofilms onto glass-FRC.

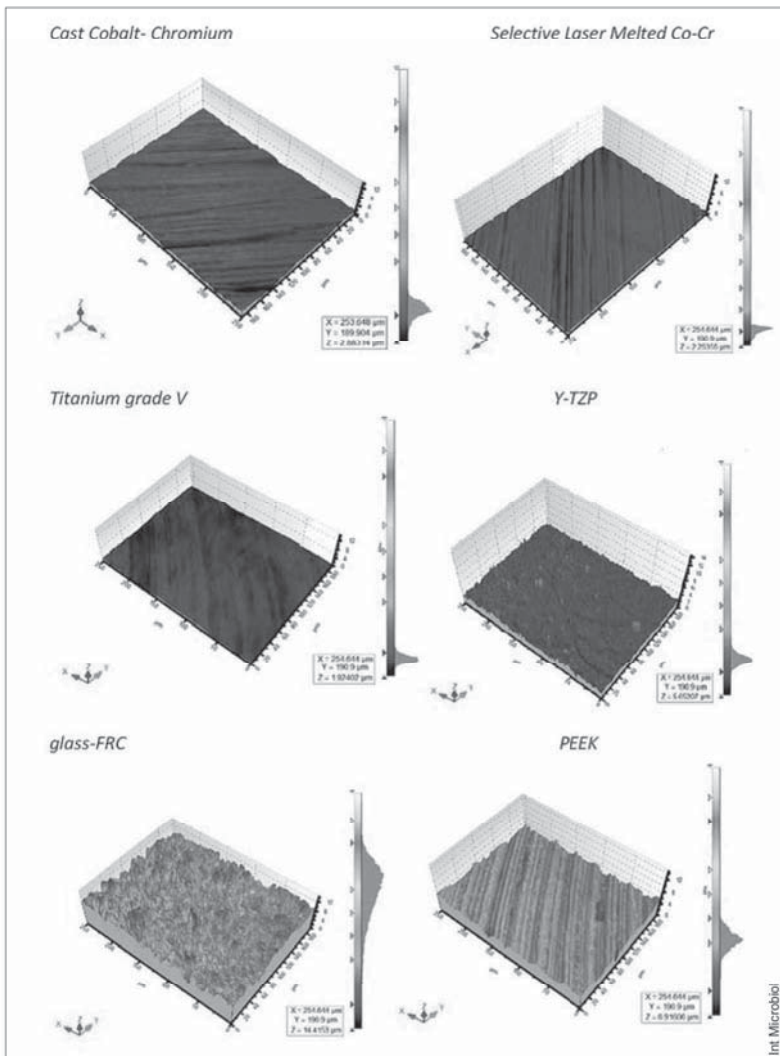


Fig. 1. Interferometry images of the six surface materials tested. (A) Cast cobalt-chromium. (B) Selective laser melted cobalt-chromium. (C) Titanium. (D) Zirconia (Y-TZP). (E) Glass-FRC. (F) PEEK polyetheretherketone.

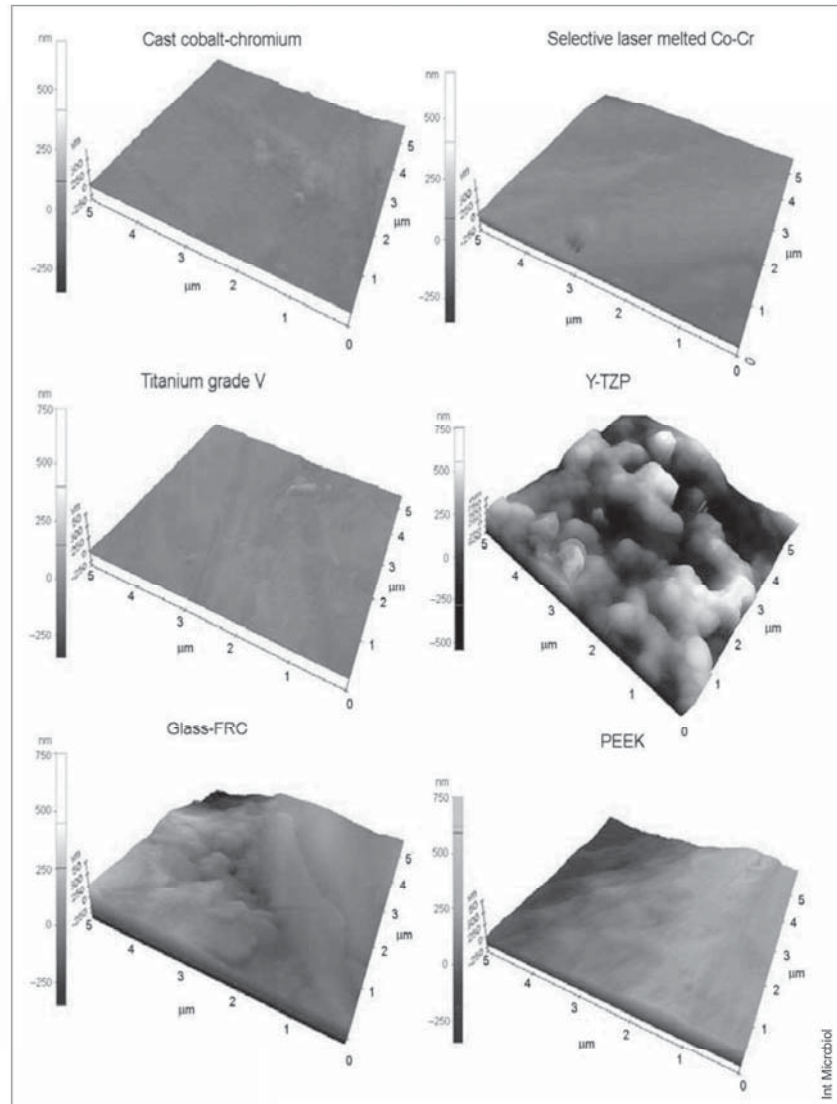


Fig. 2. AFM imaging of the six surface materials tested. (A) Cast cobalt-chromium. (B) Selective laser melted cobalt-chromium. (C) Titanium. (D) Zirconia (Y-TZP). (E) Glass-FRC. (F) PEEK polyetheretherketone.

Discussion

The ability of bacteria to form biofilms is among the most relevant factors in the pathogenesis of peri-implantitis and periodontitis. Since both gram-positive and gram-negative bacteria cause oral infections, in this study representatives of each one (*E. coli* and *S. aureus*) were used to determine bacte-

rial adhesion to the six tested materials. Our primary aim was to compare the efficiency of bacterial adhesion onto implant abutments currently in use, especially glass-FRC in order to assess its potential advantages. This focus reflects current interest in glass-FRC as an alternative to traditionally used materials. A recent report, showed that the use of glass-FRC for implant abutment or restoration material could significantly reduce physical stresses in the bone-implant contact area by

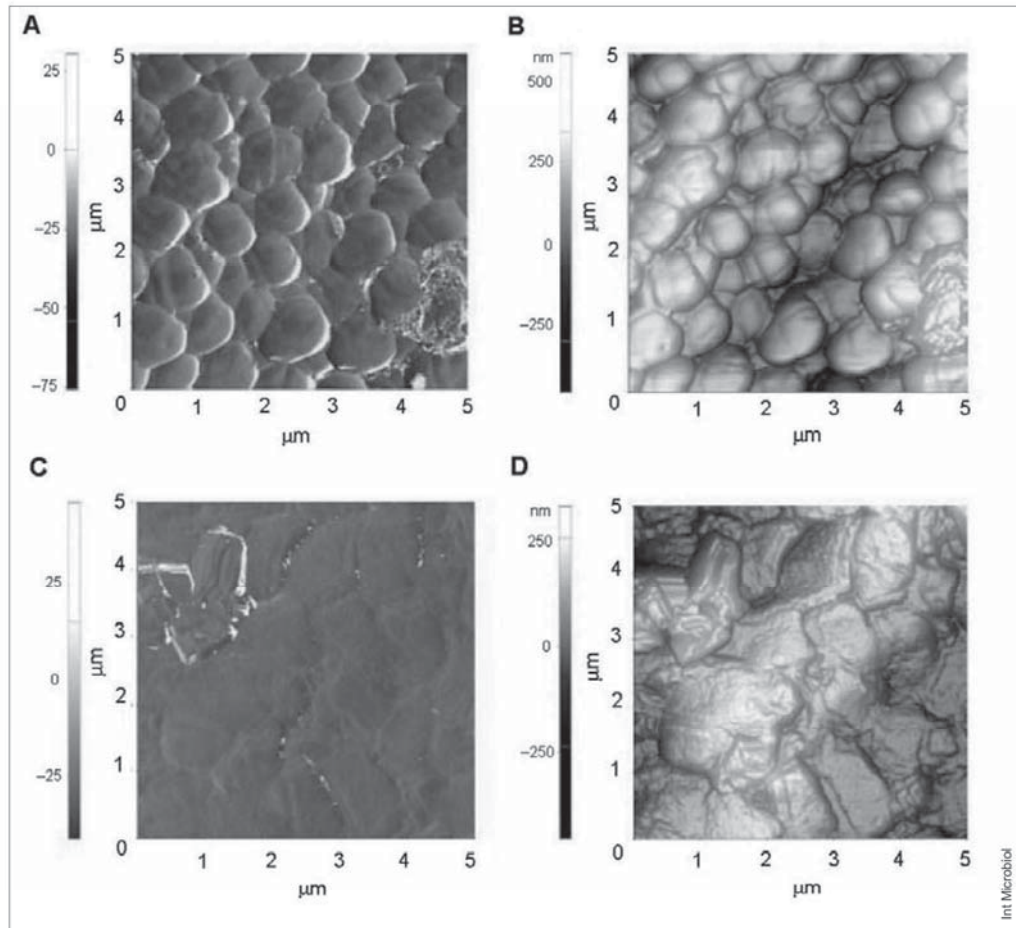


Fig. 3. AFM imaging on glass-FRC disks: (A) *Staphylococcus aureus* phase; (B) *S. aureus* topography; (C) *Escherichia coli* phase; (D) *E. coli* topography.

acting as shock-absorbers and thus minimize the risk of eventual peri-implant bone loss [18]. However, there is still much to be learned about the potential application of glass-FRC. Progress in nanotechnology allows the design and production of materials, including biomaterials, with surface properties tailored to a given application. Today, one of the main focuses of biomaterials research is the physico-chemical properties of surfaces that determine bacterial adhesion [25].

In this study, the surface parameters of dental materials were measured using three different methodologies. In surface roughness analyses, we found important differences between the studied materials, with glass-FRC being significantly rougher than the other biomaterials examined, both at micro-

and nano-scales. Interferometry measurements of surface roughness showed higher values for glass-FRC than for either zirconia (5-fold) or titanium (10-fold). Similar results were obtained with AFM, which showed that the nano-roughness of glass-FRC was twice that of zirconia and eight times that of titanium. Nonetheless, the high Ra value of glass-FRC falls within the clinically acceptable range [4,25] (Table 2). The most highly polished surface was that of SLM chrome cobalt, followed by titanium. This result contradicts a previous report in which significantly greater differences in the Ra values of similar materials, including laser sinterized chrome cobalt, were reported, although in that study a profilometer was used whereas our measurements were obtained with AFM [16].

Likewise, zirconia was much rougher when assessed using AFM rather than interferometry. The discrepancy could be due to the well-recognized differences in roughness depending on the measurement method used and to the fact that zirconia surfaces are strongly affected by the material preparation procedure. In a recent study, glazing procedures were shown to reduce the surface roughness of Y-TZP [20]. In our study, AFM imaging demonstrated strong surface differences between zirconia and cast Co-Cr, laser sinterized Co-Cr, and titanium (Fig. 2).

There have been a few reports examining the relationship between nanoscale topographical details and bacterial adhesion. Microbial adhesion was shown to be sensitive to nanoscale topography (commonly accepted with feature sizes <100 nm) but universal rules of attachment have yet to be determined. For example, some investigators have observed that the attachment of certain bacteria is higher on surfaces with nanophase than with conventional topographies [15,20], while others have found a bacteria-repelling effect of nanophase materials [19]. Our results, like those of do Nascimento et al. [7,8], do not provide insights into the relationship between roughness and bacterial adhesion.

In bacterial attachment, contact between the cell and the surface is maximized. This process is aided by the ability of bacteria to assume different morphologies and to alter the number and size of their appendages, such as flagella or pili, or the amount of capsular material depending on the topographical details of the target surface or the physiological state or growth phase [14]. Gains in our knowledge of adhesion properties have important implications for the bioengineering of materials not only for use in the oral cavity but also with respect to a wide range of medical devices.

Wettability is another key determinant of bacterial adhesion efficiency. In our study, the degree of surface hydrophobicity positively correlated with the degree of surface roughness, with the roughest surface exhibiting the highest surface hydrophobicity. This correlation is in accordance with the Wenzel model, which explains roughness-induced hydrophobicity [27], and with a 2011 study reporting similar roughness-wettability correlations [15].

Our conclusions regarding bacterial adhesion are based on experiments with two different bacterial species, *S. aureus* and *E. coli*, as mechanisms of adhesion are strongly dependent upon the structure of the bacterial envelope and thus reflect the two major types of biological and chemical organization of the bacterial surface. Although our results cannot be mechanistically extended to all microbes, large differences with other oral pathogens are not expected. As seen from the

data in Table 1, the dependence of adhesion on the physico-chemical properties of the test materials was already evident after 2 h of incubation, since the most polished surface adsorbed the lowest amount of bacteria and vice-versa. After 24 h, differences in bacterial adhesion to the test surfaces were no longer significant, consistent with the findings in previous reports [3, 9]. While at 2 h *S. aureus* adhered more efficiently, by 24 h *E. coli* adhesion had increased.

Bacterial growth on glass-FRC was similar to that measured on titanium, confirming the results obtained in a previous study [17]. The absence of a difference between the different surfaces may have been due to their wettability, since glass-FRC, is less wettable than the other materials tested. More research is needed assessing these aspects and other possible factors that may have influenced the results.

Acknowledgements. We thank Teresa Tomas for her excellent technical assistance in the preparation of the dental materials. This work was partially supported by "Ajuts a la Recerca" awarded to the School of Dentistry, University of Barcelona. The generous gift of abutment materials from Bego (Bremen, Germany), Klockner-Soadco (Andorra), Dentisel (Barcelona, Spain), Bioloren (Varese, Italy) and Tekniimplant (Barcelona, Spain) is gratefully acknowledged.

Competing interests. None declared

References

1. Adbulmajeed A, Walboomers X F, Massera J, Kokkari A K, Vallittu P K, Närhi TO (2013) Blood and fibroblast responses to thermoset BisGMA-TEGDMA/glass fiber-reinforced composite implants *in vitro*. Clin Oral Implants Res first published online: 16 apr 2013. doi: 10.1111/clr.12151
2. Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazzon M, Liley M, Ploux L (2010) The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. Acta Biomater 6:3824-3846
3. Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximénez-Fyvie LA, Schwartz Z, Boyan BD (2012) Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces *in vitro*. Clin Oral Implants Res 23:301-307
4. Barbosa SH, Zanata RL, Navarro MFL, Nunes OB (2005) Effect of different finishing and polishing techniques on the surface roughness of microfilled, hybrid and packable composite resins. Braz Dent J 16:39-44
5. Behr M, Rosentritt M, Lang R, Handel G. (2001) Glass fiber-reinforced abutments for dental implants. A pilot study. Clin Oral Implants Res 12:174-178
6. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post, C, Ehrlich, G. (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J Clin Invest. 112:1466-1477
7. do Nascimento C, da Rocha Aguiar C, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque RF Jr, Ribeiro RF (2013) Oral biofilm formation on the titanium and zirconia substrates. Microsc Res Tech 76:126-132
8. do Nascimento C, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque RF Jr, Ribeiro RF (2013) Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. Clin Oral Implants Res 00:1-7; first published online:doi: 10.1111/clr.12093

9. Egawa M, Miura T, Kato T, Saito A, Yoshinari M (2013) In vitro adherence of periodontopathic bacteria to zirconia and titanium surfaces. *Dent Mater J* 32:101-106
10. Fischer H, Weber M, Eck M, Erdrich A, Marx R (2004) Finite element and experimental analyses of polymer-based dental bridges reinforced by ceramic bars. *J Biomech* 37:289-294
11. Freilich MA, Meiers JC, Duncan JP, Eckrote KA, Goldberg AJ (2002) Clinical evaluation of fiber-reinforced fixed bridges. *J Am Dent Assoc* 133:1524-1534
12. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Cheng A, et al. (2013) The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater* 9:6268-6277
13. Gorth DJ, Puckett S, Ercan B, Webster TJ, Rahaman M, Bal BS (2012) Decreased bacteria activity on Si₃N₄ surfaces compared with PEEK or titanium. *Int J Nanomedicine* 7:4829-4840
14. Hsu L, Fang J, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI (2013) The effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 79:2703-2712
15. Ivanova EP, Truong VK, Webb HK, Baulin VA, Wang JY, Mohammadi N, Wang F, Fluke C, Crawford RJ (2011) Differential attraction and repulsion of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on molecularly smooth titanium films. *Sci Rep* 1:165-177
16. Kilicarslan MA, Ozkan P (2012) Evaluation of retention of cemented laser-sintered crowns on unmodified straight narrow implant abutments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28:381-387
17. Lassila LV, Garoushi S, Tanner J, Vallittu PK, Söderling E (2009) Adherence of *Streptococcus mutans* to fiber-reinforced filling composite and conventional restorative materials. *Open Dent J* 4:227-232
18. Magne P, Silva M, Oderich E, Boff LL, Enciso R. (2013) Damping behavior of implant-supported restorations. *Clin Oral Implants Res* 24:143-148
19. Puckett S D, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ (2010) The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials* 31:706-713
20. Rizzello L, Sorce B, Sabella S, Vecchio G, Galeone A, Brunetti V, Cingolani R, Pompa PP (2011) Impact of nanoscale topography on genomics and proteomics of adherent bacteria. *ACS Nano* 5:1865-1876
21. Sabrah AH, Cook NB, Luangruangrong P, Hara AT, Bottino MC (2013) Full-contour Y-TZP ceramic surface roughness effect on synthetic hydroxyapatite wear. *Dent Mater* 29:666-673
22. Singh AV, Patil R, Thombre DK, Gade WN (2013) Micro-nanopatterning as tool to study the role of physicochemical properties on cell-surface interactions. *J Biomed Mater Res A* 101:3019-3032
23. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hämmerle CH (2009) Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 24:616-626
24. Truong VK, Lapovok R, Estrin YS, Rundell S, Wang JY, Fluke CJ, Crawford RJ, Ivanova EP (2010) The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials* 31:3674-3683
25. Uçtaşlı MB, Bala O, Güllü A (2004) Surface roughness of flowable and packable composite resin materials after finishing with abrasive discs. *J Oral Rehabil.*31:1197-1202
26. Variola F, Brunski J, Orsini G, Tambasco de Oliveiran P, Wazen R, Nanci, A. (2011) Nanoscale surface modifications of medically-relevant metals:state-of-the art and perspectives. *Nanoscale* 3:335-3532
27. Wenzel RN (1949) Surface roughness and contact angle. *J Phys Colloid Chem* 53:1466-1467
28. Zareidoost A, Yousefpour M, Ghaseme B, Amanzadeh A (2012) The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. *J Mater Sci Mater Med* 23:1479-1488

Journal section: Oral Medicine and Pathology
Publication Types: Research

doi:10.4317/medoral.19991
http://dx.doi.org/doi:10.4317/medoral.19991

Atomic force microscopy visualization of injuries in *Enterococcus faecalis* surface caused by Er,Cr:YSGG and diode lasers

Lidia López-Jiménez ¹, Josep Arnabat-Domínguez ^{1,2}, Miguel Viñas ¹, Teresa Vinuesa ¹

¹ Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials. Dept. Pathology and Experimental Therapeutics

² Department of Dentistry. Medical and Dentistry schools. IDIBELL. University of Barcelona

Correspondence:

Department of Dentistry,
University of Barcelona,
Feixa Llarga s/n,
08907 L'Hospitalet del Llobregat,
Barcelona Spain,
joseparnabat@ub.edu

Received: 19/03/2014
Accepted: 19/06/2014

Please cite this article in press as: López-Jiménez L, Arnabat-Domínguez J, Viñas M, Vinuesa T. Atomic force microscopy visualization of injuries in *Enterococcus faecalis* surface caused by Er,Cr:YSGG and diode lasers. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. (2014), doi:10.4317/medoral.19991

Abstract

Aim: To visualize by Atomic Force Microscopy the alterations induced on *Enterococcus faecalis* surface after treatment with 2 types of laser: Erbium chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet (Er,Cr:YSGG) laser and Diode laser.

Material and Methods: Bacterial suspensions from overnight cultures of *E. faecalis* were irradiated during 30 seconds with the laser-lights at 1 W and 2 W of power, leaving one untreated sample as control. Surface alterations on treated *E. faecalis* were visualized by Atomic Force Microscopy (AFM) and its surface roughness determined.

Results: AFM imaging showed that at high potency of laser both cell morphology and surface roughness resulted altered, and that several cell lysis signs were easily visualized. Surface roughness clearly increase after the treatment with Er,Cr:YSGG at 2W of power, while the other treatments gave similar values of surface roughness. The effect of lasers on bacterial surfaces visualized by AFM revealed drastic alterations.

Conclusions: AFM is a good tool to evaluate surface injuries after laser treatment; and could constitute a measure of antimicrobial effect that can complete data obtained by determination of microbial viability.

Key Words: Atomic force microscopy, Er,Cr:YSGG laser, diode laser, *Enterococcus faecalis*, surface roughness.

Introduction

Biological diversity of oral microbiota is enormous in terms of number of species. A few of these bacteria can be isolated from root canal infections (1), post-treatment dental infections, and also from periodontal pockets (2). It has been reported that *Enterococcus faecalis* is the

microorganism most commonly encountered in root canal infections after unsuccessful endodontic treatment (3,4). The main goals of many dental therapies (periodontal, endodontal, etc.) are to repair the affected region and to achieve the elimination of these microorganisms from root canals or crevicular region.

01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

01 Several irrigant solutions, mechanical instrumentation
02 and ultrasonic debridement are commonly used in the
03 endodontic treatment (5-7). However, the morphology of
04 root canal systems is extremely intricate and frequently
05 these conventional treatments fail. Thus, it is difficult
06 to guarantee the complete eradication of pathogenic
07 bacteria in areas of difficult access such as furcations
08 and concavities (8). Similar difficulties can be claimed
09 when looking at periodontal treatments. Recently, laser
10 irradiations have been introduced into endodontic treat-
11 ment as a suitable method to improve disinfection since
12 its bactericidal effect has been well established (8,9).
13 The Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-
14 Garnet (Er,Cr:YSGG) laser and Diode laser, at wave-
15 lengths of 2,780 nm and 940 nm, respectively, are two
16 different light sources widely used in dentistry. Den-
17 tinal tubules and enamel prisms can act as light con-
18 ductors that keep the bactericidal effect of laser light
19 and increase penetration depth. Previous studies have
20 explored the antimicrobial effect of both types of las-
21 ers. These reports were performed in different models
22 of experimentally infected root canals (8,10,11). On the
23 contrary, periodontal region seems to be inert to laser
24 transmission.
25 Techniques such as Scanning Electron Microscopy
26 (SEM), Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)
27 and Atomic Force Microscopy (AFM), are being used
28 in dentistry research to characterize dentine, enamel
29 and biomaterial surfaces, as well as to study the effect
30 of laser treatments on tooth tissues and bacterial cells.
31 SEM provides two-dimensional images of large areas
32 of the surface, but is necessary previous dehydration
33 and fixation that can affect the properties of the stud-
34 ied material. CLSM techniques give three-dimensional
35 reconstructions of the subsurface of the samples with
36 a similar resolution than SEM acquired images (12).
37 AFM is a well-recognized powerful tool to visualize
38 biological samples at the sub-molecular level achieving
39 high-resolution images and the study of properties such
40 as surface roughness; it also gives information concern-
41 ing cell processes and interactions between microor-
42 ganisms (13). Additionally, it does not need any special
43 preparation of the sample that can produce alterations
44 on the structure, moreover imaging in Non-Contact
45 mode prevent any destruction of the sample. For this
46 reason, AFM was used in this work to visualize dam-
47 age on *E. faecalis* surface induced after treatment with
48 Er,Cr:YSGG laser and Diode laser.
49 Growth conditions, nutrient availability, and environ-
50 mental features inside the root canal are much more
51 unfavourable for microbial growth than laboratory me-
52 dia, at least ex vivo. Thus, the widely used experimental
53 strategy consisting in viable bacterial counts of survi-
54 vors can in fact, underestimate the real antibacterial ef-
55 fect of laser light since injured individuals in optimal
56
57
58
59

environmental conditions, such as those provided by
laboratory rich medium, can repair injuries and subse-
quently be able to form colonies whereas they would
be unable to survive inside the canals. In this context,
visualization of injuries caused in the bacterial surface
could be a tool to estimate the level of damage and sub-
sequently a useful approach to the clinical outcome of
laser irradiation. Although sodium hypochlorite (NaO-
Cl), the most commonly used irrigant solution in endo-
dentic treatment, seems to be a suitable method to exert
bactericidal effect in root canals on the basis of bacterial
counts, its toxicity for human cells should be taken into
account. In this paper, using AFM techniques, we were
able to obtain and compare imaging and roughness of
microbial surfaces of a bacterium that causes most of
the endodontic treatment failures.

Material and Methods

- Bacterial strain and culture media

E. faecalis, American Type Culture Collection (ATCC)
29212 was used to study and compare the effectiveness
of the two laser-light based treatments. Trypticase soy
broth (TSB) was purchased from Scharlab (Barcelona,
Spain). Distilled water was used to wash cells.

- Laser-light types

We used two different light sources. Er,Cr:YSGG la-
ser system (Waterlase MD; Biolase Technology, Irvine,
CA, USA) emits at a wavelength of 2,780 nm, in pulses
of 140 and 750 ms, and a repetition rate of 10-50 Hz.
Laser light is transferred from the source to the hand
piece through optical fibre. The hand piece was an MVP
(Biolase) and the tip was the radial firing tip (Waterlase
MD Endolase RFT; diameter = 200 μ m; length = 25
mm) designed for endodontic treatment (loss of power
about 70%). Power was measured at the beginning
using a watt meter (Coherent Inc., Santa Clara, USA).
Tips were autoclaved before being used. 1 W and 2 W
of power (display) were applied, at 20 Hz (20 pulses/s);
thus, it was between 50 mJ and 100 mJ. Actual power
was calculated on the basis of 30% efficacy (based on
the diameter of the tip (200 μ m), giving values of 0.3
W and 0.6 W, respectively (15 mJ and 30 mJ per pulse).
The diode laser (InGaAsP; Ezlase, Biolase Technology,
Irvine, CA, USA) emitting at a wavelength of 940 nm
was also used. It can operate in pulsed or continuous
mode and a repetition rate ranging from 0.06ms to 10
sec. It was provided of an endodontic tip (ezTip Endo,
14 mm / 200 μ m). In this study we used it at 1 W or 2
W in pulsed mode with intervals of 1.0 ms and pulse
length of 1.0 ms.

- Experimental procedures

Bacteria were grown in 10 ml of TSB medium at 37°C
overnight. The cultures were then centrifuged at 7000
rpm for 10 min in a Hermle centrifuge model Z 230 MA
and then washed with distilled water. The tips of laser

01 devices were submerged in the suspension and constant
02 and helical movements were made during 30 sec. Irra-
03 diation was performed in microtubes (PCR-02-A). The
04 co-axial water spray and air were switched off. 1 W and
05 2 W of power of Er,Cr:YSGG laser and Diode laser were
06 applied to 100 μ l of the bacterial suspensions during 30
07 seconds. For cell immobilization and visualization under
08 atomic force microscopy, 10 μ l of treated and untreated
09 bacterial suspensions were immediately transferred to
10 mica Grade V-4 slides (SPI Supplies, USA) and air dried
11 at room temperature in a dust-free environment.

12 - Atomic force microscopy visualizations

13 Samples were imaged by using an Atomic Force Micro-
14 scope XE-70 (Park Systems, Korea). All images were
15 collected in Non-contact mode by using pyramidal-
16 shaped silicon cantilevers with a spring constant of \pm
17 40 N/m and a resonance frequency of \pm 300 kHz. The
18 upper surface of these cantilevers (the opposite side of
19 the tip) is coated with aluminium to enhance the laser
20 beam reflectivity. The acquired data during the surface
21 scanning were converted into images of topography,
22 amplitude and phase; and analysed by using XEP and
23 XEI software (Park Systems, Korea). The Non-contact
24 mode provides topography, amplitude and phase im-
25 ages. On topography images it is possible to observe the
26 shape, structure and differences of the sample surface.
27 Furthermore, amplitude images highlight the outline
28 and allow the visualization of fine surface details of the
29 sample. Finally, the phase images show variations in
30 elasticity and viscoelasticity of the sample (14). AFM
31 images were simultaneously acquired with several scan
32 sizes (100 μ m², 25 μ m² and 6.25 μ m²) at a scan rate of
33 0.3-0.5 Hz.

34 - Surface roughness

35 AFM was also used to measure the surface roughness
36 of treated and untreated cells. Roughness average (Ra)
37 was calculated from the acquired topography images
38 for every scan size and laser-light type. Ra represents
39 the average distance from the roughness profile to the
40 centre plane of the profile.

41 Results

42 - Visualization of *E. faecalis* treated with Er,Cr:YSGG 43 laser

44 AFM topography and amplitude images obtained after
45 treatment of *E. faecalis* suspensions with Er,Cr:YSGG
46 laser at both 1 W and 2 W, as well as AFM images of
47 untreated bacteria are shown in figure 1. Topography
48 images gave information about surface and structure
49 differences whereas amplitude images allowed a better
50 observation of surface characteristics and fine details
51 (15). Comparing all AFM images, it was feasible to ob-
52 serve that after high potency of laser treatment, both
53 cell morphology and surface resulted altered. Images of
54 100 μ m² size (Fig. 1 topography images) were acquired
55

in order to obtain an overview of the sample, but do not
provide relevant information since it was not possible to
distinguish alterations in bacterial surfaces. On the con-
trary amplitude images of 25 μ m² and 6.25 μ m² sizes
allowed the observation damages as cell morphology al-
terations and distortions on bacterial surfaces. Untreat-
ed *E. faecalis* cells appeared as typical coccoid shape
(Fig. 1a). In contrast, changes in surface morphology
and cell lysis signs were observed after treatment with
Er,Cr:YSGG at 1 W (Fig. 1b) and 2 W of power (Fig.
1c), i.e. Stretch marks on the cell surface, bacterial wall
destruction and lose of typical cell morphology. In addi-
tion to these signs, leakage of intracellular content was
noticed on cells treated at 2 W of power (Fig. 1c), that
indicates that Er,Cr:YSGG at this power could cause
more damage on bacterial cells than at 1 W of power.

- Visualization of *E. faecalis* treated with Diode laser
Images provided by AFM microscopy of treated bacte-
rial cells with Diode laser at 1 W and 2 W of power
are shown in figure 2. Stretch marks on the cell sur-
face, leakage of intracellular content and lose of typi-
cal cell morphology were observed as a result of both
treatments. Moreover, in amplitude images of 6.25 μ m²
scan size, some blebs and shape perturbations could be
clearly appreciated along the bacterial cell surface; it
seems feasible that this probably constitute another sign
of bacterial lysis. AFM images showed that Diode laser
could cause severe damages on *E. faecalis* cell surface,
at both 1 W (Fig 2a) and 2 W (Fig. 2b) of power.

- Surface roughness

In order to quantify the observed changes on bacterial
cell surfaces treated, roughness measurements were per-
formed by using the parameters provided by XEI software
(Park Systems, South Korea) from topography images
obtained previously at different scan sizes of 100 μ m²,
25 μ m² and 6.25 μ m². Figure 3 represents mean surface
roughness values (Ra) of untreated *E. faecalis*, and the
same microorganism after treatment with Er,Cr:YSGG
and with Diode laser, both of them at 1 W and 2 W of
power. Analysing all obtained data, Er,Cr:YSGG laser
at 2W of power produces the highest increase of surface
roughness. By contrast, values of roughness obtained af-
ter the rest of laser treatments resulted to be similar as
those obtained in untreated *E. faecalis*.

Discussion

Microscopic techniques are being used in dentistry to
characterize several types of surfaces and also to ana-
lyze quantitatively morphological changes on these
surfaces after treatment. Dentine examination, visuali-
zation of root canals colonized by *E. faecalis*, evalua-
tion of the effect of several laser radiations on root and
enamel surfaces, and also the bactericidal effect of laser
treatments have been studied by SEM (16-19). CLSM
techniques have been used to analyse the subsurface of

01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

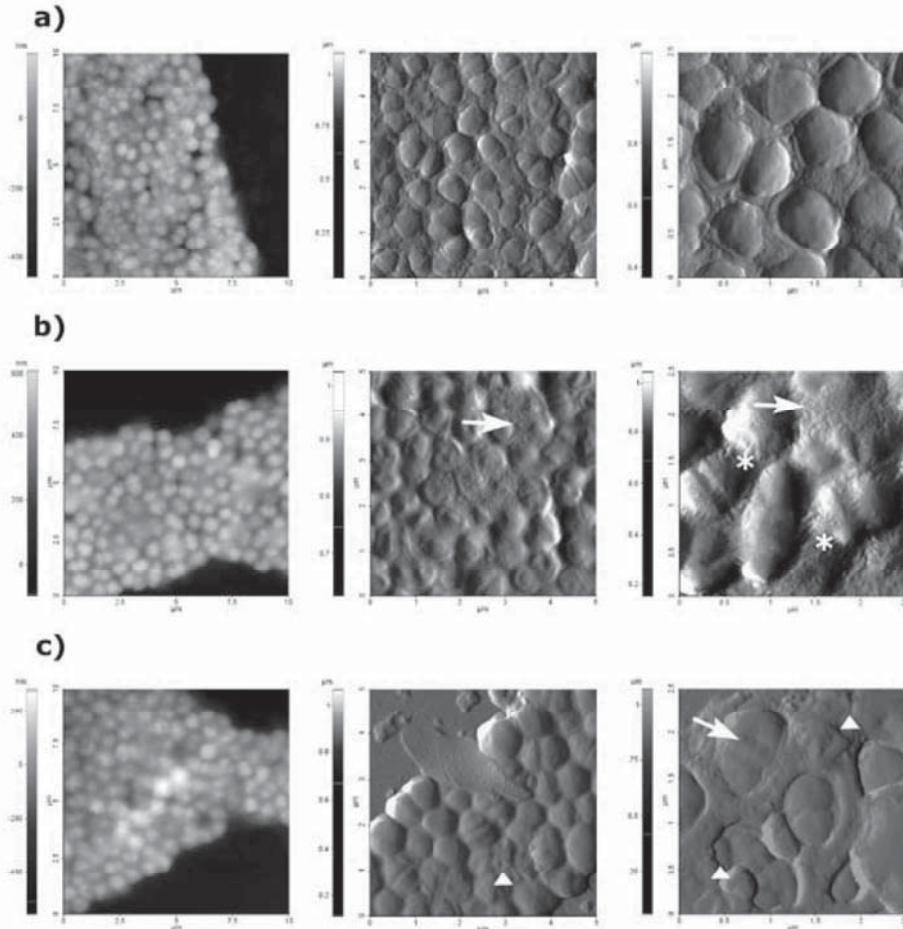
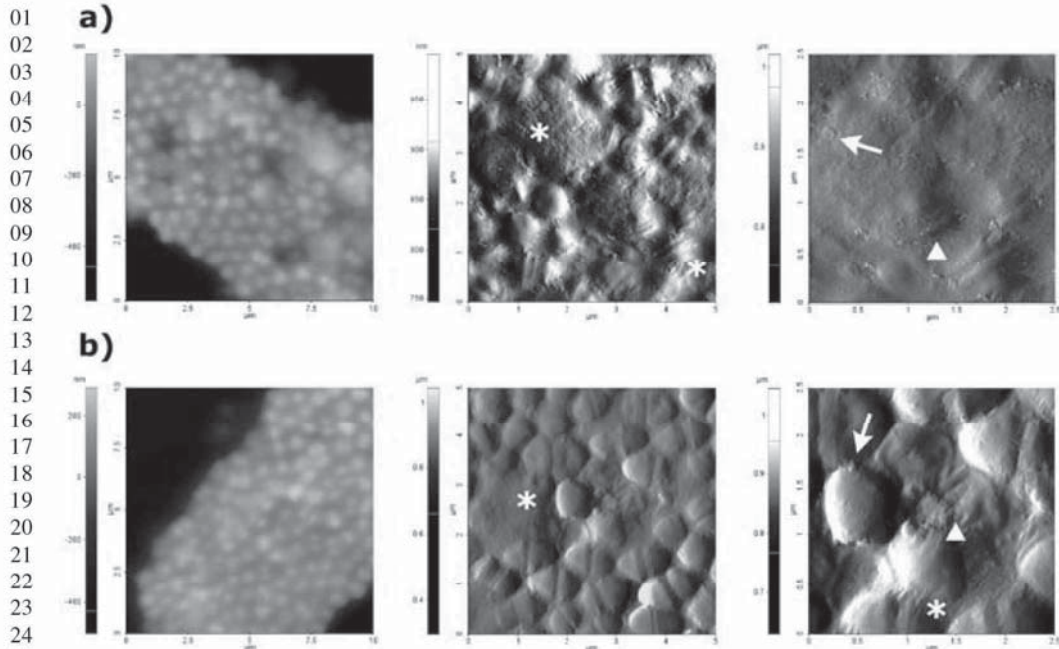


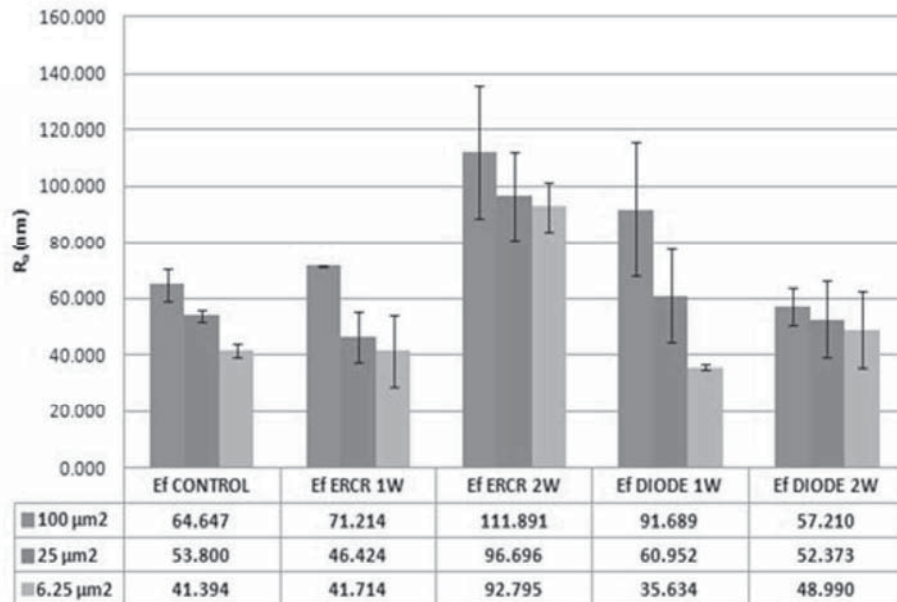
Fig. 1. AFM images obtained at difference scan sizes (100 μm^2 , 25 μm^2 and 6.25 μm^2) of untreated *E. faecalis* (a), after treatment with Er,Cr:YSGG laser at 1W (b) and 2W of power (c). First column shows topography images, whereas amplitude images are shown in second and third column. Stretch marks are represented by asterisks, bacterial wall destruction or loss of typical cell morphology are represented by arrows, and leakage of intracellular content is represented by triangles.

enamel and dentine after laser-light treatments (20,21). AFM has been recently introduced in dentistry as a sensitive and non-destructive tool for dentine surface characterization and quantification, to investigate mechanical properties of the dentine as well as to image dental tissue surfaces after laser-light treatments (16,22). In this work, AFM was used to visualize the damage induced on *E. faecalis* surfaces after treatment with two different light sources, Er,Cr:YSGG laser and Diode laser. Both types of laser are being used in oral medicine and dermatology for surgical and antimicrobial purposes. In 2010 we showed that Er,Cr:YSGG laser could be useful in dentistry to disinfect experimentally colonized root canals (11). Moreover, diode laser radiation

gives similar results and, subsequently, is also useful for similar purposes (8). AFM allows visualizing of microbial surfaces both in air and in liquid. Imaging in liquid is more complicated from experimental point of view, at least in part, due to the poor adhesion of microbial cells to the substrate. This arise the noise during scanning and the resolution of obtained images is unsatisfactory (23). On the other hand, sample preparation for air imaging is easier and this mode of imaging reveals the overall morphology and topographic features of microbial cells surfaces that can be missed in liquid imaging (24). We have performed AFM measures in air as this mode of imaging is commonly used to evaluate morphological changes in microbial surfaces caused by



26 **Fig. 2.** AFM images obtained at a difference scan sizes (100 μm^2 , 25 μm^2 and 6.25 μm^2) after treatment with Diode laser at 1W (a) and
 27 2W (b) of power. First column shows topography images, whereas amplitude images are shown in second and third column. Stretch marks
 28 or lose of typical cell morphology are represented by asterisks, blebs are represented by arrows, and shape perturbations are represented
 29 by triangles.



54 **Fig. 3.** Graphical representations of surface roughness (Ra) in nanometers, according to the surface scan sizes, laser type
 55 and power used. Bars represented the standard error of the mean. Obtained values of mean surface roughness are shown
 56 in the table below.

01 several treatments (25,26). Moreover, imaging of un-
02 treated/control bacteria revealed neither morphological
03 changes nor increases in nanoroughness values.

04 When doing imaging by AFM of bacterial cell suspen-
05 sions of *E. faecalis* after treatment with both lasers at
06 different power (Fig. 1 and Fig. 2), it became clear that
07 both lasers caused severe damage on bacterial surfaces
08 as well as changes in bacterial morphology (size and
09 shape). In addition to this, cell lysis signs could be ob-
10 served in the AFM images acquired. Lee *et al.* (19), using
11 SEM, observed morphological changes in *Strepto-*
12 *coccus mutans* cells treated by a diode laser at several
13 powers. Severe damages on bacterial cells were cor-
14 related with high laser powers; SEM acquired images
15 revealed changes on lased bacteria such as loss of their
16 wall bands, disintegration and fusion of cells with pores
17 on the cell wall.

18 A relevant parameter to characterize the morphology of
19 surfaces is the determination of the surface roughness
20 (Ra), which represents the arithmetic average rough-
21 ness (27). Surface roughness increased greatly after
22 performing laser treatment. Moreover, a drastic effect
23 on the shape was observed; i.e. bacterial cells appeared
24 deformed and total lysis and leakage of cellular content
25 could be seen (Fig. 1c, Fig. 2). This causes an increase
26 in the surface roughness of the area that can be detected
27 by AFM microscopy (Fig. 3).

28 When trying to correlate obtained AFM images, and
29 surface roughness data with bacterial damaging, treat-
30 ments with Er,Cr:YSGG laser at 2 W of power caused
31 the most apparent morphological effect on bacteria. Spe-
32 cifically when comparing all AFM amplitude images of
33 25 μm^2 and 6.25 μm^2 , we were able to observe remark-
34 able changes on surface and morphology, as well as
35 lysis signs in *E. faecalis* cells treated with Er,Cr:YSGG
36 at 2 W. Surface roughness data were higher after this
37 treatment as the other carried out in this study. Subse-
38 quently, one can assume that it could be the most effec-
39 tive treatment to eliminate and eradicate bacteria. The
40 effects produced by treatment with Er,Cr:YSGG laser
41 at 1 W, Diode laser at 1W and at 2 W of power, were
42 almost identical in respect of surface and shape induced
43 modifications.

44 These two lasers lights have the same photothermal ef-
45 fect despite their differences in the interactions with the
46 target tissue. Er,Cr:YSGG laser is strongly absorbed by
47 water, whereas water absorbs diode laser at a lesser ex-
48 tent. Moreover it has a high affinity for hydroxiapatite,
49 water is vaporized by a photo-thermal effect and the ex-
50 pansion of water vapour generates a photo-mechanical
51 effect that could remove the smear layer on the denta-
52 l surface, and also could disrupt intratubular bacte-
53 ria (10). In contrast, Diode laser is poorly absorbed by
54 tooth structures, the thermal effect of the radiation is
55 transmitted in depth through the dentine with a low in-

56 teraction with it, allowing a photo-disruptive effect on
57 microorganisms present in the unreachable parts of the
58 tubular network (28). The results obtained in the present
59 study showed that Er,Cr:YSGG laser was more efficient
in bacterial elimination than diode laser, despite several
studies have reported higher bactericidal effect of the
last one (29). A possible explanation for the better bac-
tericidal effect of Er,Cr:YSGG laser found in this study
could be related with the fact that all experiments were
performed by using suspended bacteria, and the high
water content of suspensions instead solid media may
apparently enhance the Er,Cr:YSGG effectiveness.

When evaluating the antimicrobial effect of light most
authors have designed strategies on the basis of ex-
perimental colonization, followed by the recovery of
microbes and enumeration of surviving bacterial popu-
lations. In all cases, cultivation of microorganisms to
enumerate survivors is made in rich bacteriological me-
dia such as blood agar (30). The wide variety of complex
nutrients from blood agar supports the growth of most
bacteria facilitating the reparation of certain injuries
which are not enough to induce cell death. However,
growth conditions, nutrient availability, and environ-
mental features inside the root canal are much more
unfavourable for microbial growth. Thus, viable bacte-
rial enumeration in artificial media can underestimate
the real antibacterial effect of laser light, since to a cer-
tain extent bacterial cells with moderate damaging can
repair lesions and multiply which probably will never
happen into a root canal. In this study, we were able to
visualize *E. faecalis* surface injuries by AFM just after
treatment and perform a comparative study of microbial
surface roughness. Our results are agree with previous
studies, in which the effectiveness of Er,Cr:YSGG laser
against *E. faecalis* in infected root canals was evaluated
by cultivation to enumerate survivors. Wang *et al.* (19)
reported that the reduction of *E. faecalis* inside root
canals after treatment by Er,Cr:YSGG at 1 W and 2 W
of power was 77% and 96%, respectively. These find-
ings are in agreement with Yavari *et al.* (16), who dem-
onstrated that Er,Cr:YSGG at 2 W and 3 W of power
was able to reduce the number of bacteria by 97.6% and
98.47%, respectively. According to the literature, the
Er,Cr:YSGG laser at high power has shown an impor-
tant bactericidal effect against *E. faecalis*.

Conclusion

The AFM technique was useful to compare the effi-
ciency of two types of lasers commonly used in den-
tistry. It provided visualizations of topographical and
morphological changes on *E. faecalis* cells caused by
laser irradiation, and also quantitative information of
surface roughness. In this study, we can conclude that
Er,Cr:YSGG at 2 W of power is the most effective in the
extent of injuries and damages produced on bacterial

cell surfaces. Since bacteria infecting root canals tends to form biofilm, further work to estimate the effect of Laser therapies on the integrity of bacterial biofilm is currently being developed. Further work is in progress to demonstrate similar damage evaluation in bacteria belonging to other taxa (Gram negative, Mycolata and others).

References

- Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7:257-62.
- Tanner AC, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J Periodontol Res.* 1984;19:279-91.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36:1-11.
- Stuart CH, Schwartz SA, Deeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32:93-8.
- Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981;89:321-8.
- Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA, Walton AJ. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic cavitation and its relevance. *J Endod.* 1988;14:486-93.
- Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J.* 1997;30:279-82.
- Beer F, Buchmair A, Wernisch J, Georgopoulos A, Moritz A. Comparison of two diode lasers on bactericidality in root canals: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2012;27:361-4.
- Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, et al. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med.* 2012;44:824-31.
- Gordon W, Atabakhsh VA, Meza F, Doms A, Nissan R, Rizozi I, et al. The antimicrobial efficacy of the erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser with radial emitting tips on root canal dentin walls infected with *Enterococcus faecalis*. *J Am Dent Assoc.* 2007;138:992-1002.
- Arnabat J, Escrivano C, Fenosa A, Vinuesa T, Gay-Escoda C, Berini L, et al. Bactericidal activity of erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet laser in root canals. *Lasers Med Sci.* 2010;25:805-10.
- Guerreiro-Tanamaru JM, Nascimento CA, Faria Júnior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanamaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J.* 2014;doi:10.1111/iej.12248
- Dorobantu LS, Goss GG, Burrell RE. Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron.* 2012;43:1312-22.
- Dorobantu LS, Bhattacharjee S, Foght JM, Gray MR. Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir.* 2008;24:4944-51.
- Dubrovín EV, Voloshin AG, Kraevsky SV, Ignatyuk TE, Abramchuk SS, Yaminsky IV et al. Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria. *Langmuir.* 2008;24:13068-74.
- Kubínek R, Zapletalová Z, Vůjtek M, Novotný R, Kolářová H, Chmelíková H, et al. Sealing of open dentinal tubules by laser irradiation: AFM and SEM observations of dentine surfaces. *J Mol Recognit.* 2007;20:476-82.
- Bago I, Plecko V, Gabric Panduric D, Schauperl Z, Baraba A, Anic I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J.* 2013;46:339-47.
- Ting CC, Fukuda M, Watanabe T, Aoki T, Sanaoka A, Noguchi T. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation on the root surface: Morphologic analysis and efficiency of calculus removal. *J Periodontol.* 2007;78:2156-64.
- Lee BS, Lin YW, Chia JS, Hsieh TT, Chen MH, Lin CP, et al. Bactericidal effect of diode laser on *Streptococcus mutans* after irradiation through different thickness of dentin. *Lasers Surg Med.* 2006;38:62-9.
- Ebihara A, Majaron B, Liaw LH, Krasieva TB, Wilder-Smith P. Er:YAG laser modification of root canal dentine: Influence of pulse duration, repetitive irradiation and water spray. *Lasers Med Sci.* 2002;17:198-207.
- Yamada MK, Watari F. Imaging and non-contact profile analysis of Nd:YAG laser-irradiated teeth by scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. *Dent Mater J.* 2003;22:556-68.
- Rodríguez-Vilchis LE, Contreras-Bulnes R, Olea-Mejía OF, Sánchez-Flores I, Centeno-Pedraza C. Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. *Photomed Laser Surg.* 2011;29:493-500.
- Bolshakova AV, Kiselyova OI, Filonov AS, Frolova OY, Lyubchenko YL, Yaminsky IV. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy.* 2001;86:121-8.
- Gillis A, Dupres V, Delestrait G, Mahillon J, Dufrêne YF. Nanoscale imaging of *Bacillus thuringiensis* flagella using atomic force microscopy. *Nanoscale.* 2012;4:1585-91.
- Canetta E, Walker GM, Adya AK. Nanoscopic morphological changes in yeast cell surfaces caused by oxidative stress: an atomic force microscopic study. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19:547-55.
- Sahu K, Bansal H, Mukherjee C, Sharma M, Kumar P. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B.* 2009;96:9-16.
- Botta SB, Ana PA, de Sa Teixeira F, da Silveira Salvadori MC, Matos AB. Relationship between surface topography and energy density distribution of Er,Cr:YSGG beam on irradiated dentin: an atomic force microscopy study. *Photomed Laser Surg.* 2011;29:261-9.
- de Souza EB, Cai S, Simionato MR, Lage-Marques JL. High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:e68-72.
- Preehthee T, Kandaswamy D, Arathi G, Hannah R. Bactericidal effect of the 908 nm diode laser on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *J Conserv Dent.* 2012;15:46-50.
- Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22:9-13.

Acknowledgements

This work was supported by grant ACES B10 from the Bellvitge Health Sciences Campus, University of Barcelona.

Lasers in Medical Science
Effects of photodynamic therapy on Enterococcus faecalis biofilms
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	LIMS-D-14-00307
Full Title:	Effects of photodynamic therapy on Enterococcus faecalis biofilms
Article Type:	Original Article
Keywords:	biofilm; atomic force microscopy; nanoroughness; Confocal Laser microscopy.
Corresponding Author:	Miguel Vinas, PhD University of Barcelona Hospitalet, Barcelona SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Barcelona
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Lidia López-Jiménez, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Lidia López-Jiménez, MSc Ester Fusté, PhD Blanca Martínez-Garriga, PhD Josep Amabat-Dominguez, DDS, PhD Teresa Vinuesa, MD, PhD Miguel Vinas, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Microbial biofilms in the oral cavity are involved in almost all infectious pathologies of the oral cavity. This has led to the search for novel therapies specifically aimed at biofilm elimination. In this study, we used atomic force microscopy (AFM) to visualize injuries and to determine surface roughness, as well as confocal laser scanning microscopy (CLSM) to enumerate live and dead bacterial cells, and determinations to examine the effects of photodynamic therapy (PDT) on Enterococcus faecalis biofilms. The AFM images showed that PDT consisting of methylene blue and diode laser or toluidine blue and LED light induced severe damage, including cell lysis, to E. faecalis biofilms, with the former also causing an important increase in surface roughness. These observations were confirmed by the increase in dead cells determined using CLSM. Our results highlight the potential of PDT as a promising method to achieve successful oral disinfection.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms

López-Jiménez L¹, Fusté E¹, Martínez-Garriga B¹, Arnabat-Domínguez J^{1,2},
Vinuesa T¹, Viñas M^{1*}.

(1) Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials. Dept. Pathology and Experimental Therapeutics. Medical School and (2) Dept. Dentistry. Dentistry School. IDIBELL-University of Barcelona. Spain.

Miguel Viñas Ciordia
Lab. Mol Microbiol and Antimicrob
Medical School. IDIBELL-University of Barcelona
Campus Bellvitge E-08907. Hospitalet
Barcelona (Spain)
mvinyas@ub.edu

Abstract

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Microbial biofilms in the oral cavity are involved in almost all infectious pathologies of the oral cavity. This has led to the search for novel therapies specifically aimed at biofilm elimination. In this study, we used atomic force microscopy (AFM) to visualize injury and to determine surface roughness, as well as confocal laser scanning microscopy (CLSM) to enumerate live and dead bacterial cells, and determinations to examine the effects of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilms. The AFM images showed that PDT consisting of methylene blue and diode laser or toluidine blue and LED light induced severe damage, including cell lysis, to *E. faecalis* biofilms, with the former also causing an important increase in surface roughness. These observations were confirmed by the increase in dead cells determined using CLSM. Our results highlight the potential of PDT as a promising method to achieve successful oral disinfection.

Key Words

Atomic force microscopy, Confocal laser scanning microscopy, Photodynamic therapy, *Enterococcus faecalis*, Surface roughness.

Introduction

1
2
3
4 A microbial biofilm is a three-dimensional, complex structure attached to a surface or
5 interface and comprising microorganisms embedded in an extracellular polymeric
6 matrix [1]. Although laboratory studies of biofilm formation and structure commonly
7 make use of monospecies biofilms, in nature, biofilms are frequently formed by more
8 than one species and in some cases by hundreds of species. An excellent example is oral
9 biofilms, referred to as dental plaques [3, 4]. These typically contain an enormous
10 variety of bacterial species, many of which are responsible for infections in the oral
11 cavity and even elsewhere in the body [2]. Dental caries, periodontal diseases,
12 endodontic infections, and numerous pathologies beyond the oral cavity have been
13 attributed to the proliferation of oral bacteria and their ability to form and participate in
14 stable polymicrobial biofilms.
15

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Microbes living in a biofilm are subjected to environmental conditions that promote behaviors clearly different from those of planktonic forms. Transcriptomics studies have identified several genes that are over-expressed in sessile vs. planktonic bacteria whereas other genes are down-regulated [5]. In addition, bacteria in biofilms are typically much more resistant to antimicrobials than their planktonic counterparts [6], although the latter are used in the clinical testing of susceptibility.

Oral bacteria grow exclusively (or almost) in biofilms. Thus, the main goal of oral disinfection is biofilm destruction, together with elimination of the remaining viable bacteria. Because of its anatomical complexity, the root canal system acts as a reservoir of several bacterial species that grow in biofilms. Mechanical disruption and antimicrobial therapies are currently the most frequently used methods to treat and eliminate oral biofilms; however, the effectiveness of these strategies is limited by the emergence of resistant microorganisms and the common persistence of a small proportion of viable bacteria, both of which can largely if not completely regenerate the community [7]. Consequently, there has been extensive research into the development of alternative therapeutic methods, such as laser light treatments and photodynamic therapy (PDT) [8, 9]. In the former, high-power lasers are used together with an intracanal optical fiber first to kill the microorganisms by means of a photothermal effect and then to disinfect areas unreachable by traditional endodontic treatments [10–12]. However, high-power lasers may cause thermal injuries to dental tissues, such as

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

dentin carbonization and cratering, root resorption, cementum melting, and periradicular necrosis [13–15]. Thus, PDT, in which low-power lasers drive photochemical reactions, has been suggested as a promising approach to fight oral infections without the undesirable effects associated with temperature increases. PDT is based on the use of photosensitizers, molecules that are activated by light in the presence of air. Activation leads to the generation of highly reactive singlet oxygen and free radicals that have cytotoxic effects on living cells [2]. Singlet oxygen is a diamagnetic form of oxygen and is responsible for the damaging effects of sunlight on organic materials. It is usually produced by means of photosensitizer pigments (most of them vital stains) and is stable for over an hour at room temperature. PDT has been used to kill cancer cells and bacteria, by exploiting their sensitivity to singlet oxygen. In principle, photosensitizers can penetrate both gram-positive and gram-negative bacteria, without affecting host cell viability [16]. Moreover, bacteria are unlikely to develop resistance to repeated photosensitization [17]. Several studies have reported the successful use of PDT in reducing bacterial counts in the root canal system, recommending it as an adjunctive antimicrobial procedure in conventional endodontic treatment [18–21].

In this study, we examined the effects of PDT on biofilms of *Enterococcus faecalis*, a gram-positive bacterium resistant to some antibiotics and frequently found in the oral cavity of patients who have undergone root canal treatment. Our combined approach consisted of atomic force microscopy (AFM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), and surface roughness determinations. The results highlight the potential of PDT to achieve successful oral disinfection.

Material and methods

Bacterial strain, culture conditions, and biofilm formation

E. faecalis, American Type Culture Collection (ATCC) 29212, was grown overnight in 20 ml of trypticase soy broth (Scharlau, Barcelona, Spain) at 37°C with orbital shaking at 250 rpm. The culture was used to inoculate 24-well culture plates containing 2 ml of growth medium to yield a bacterial concentration of 10^6 colony-forming units (cfu)/ml. Each well contained a Thermanox coverslip previously coated with a 0.01% (w/v) poly-L-lysine hydrobromide (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) solution to enhance bacterial cell adhesion and to prevent biofilm removal during the experiments. The plates were incubated at 37°C for 24 h under gentle shaking (60 rpm) to allow biofilm formation.

Photosensitizers and light sources

The photosensitizers tested in this study consisted of two dyes, toluidine blue O (TBO), at 0.1 mg/ml, and 3,7-bis(dimethylamino)-phenazathionium chloride trihydrate (methylene blue, MB), at 0.005% (w/v) in phosphate-buffered saline containing hydroxymethylcellulose as a mucoadhesive viscosity agent (Periowave, Ondine Biopharma, Vancouver, BC, Canada). Both TBO and MB are commonly used in oral antimicrobial PDT. Their activities as potent photosensitizers against gram-negative and gram-positive bacteria were previously documented [2].

A light-emitting diode (LED) lamp (FotoSan; CMS Dental, Copenhagen, Denmark), emitting in the red spectrum with a power peak at 628 nm, was used as the light source together with TBO. The LED lamp has an output power of 1000 mW, an intensity of 2000 mW/cm², and an energy density of 20 J cm⁻² for 10 s. For MB, diode laser light (Periowave; Ondine Biopharma, Vancouver, Canada) emitting at a wavelength of 670 nm served as the light source. It has a maximum output power of 140 mW and an energy density of 21 J/cm².

PDT

The biofilms were gently washed with distilled water to remove non-adherent bacteria. The experimental conditions were: (i) biofilms sensitized with TBO in darkness for 1 min, (ii) biofilms sensitized with TBO in darkness for 1 min and then treated with LED for 30 s, (iii) biofilms sensitized with MB in darkness for 1 min, (iv) biofilms sensitized

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

with MB in darkness for 1 min and then exposed to diode laser for 30 s. The controls consisted of: (i) biofilms treated neither with photosensitizers nor with light sources, (ii) biofilms treated only with the diode laser for 30 s, and (iii) biofilms treated only with the LED lamp for 30 s. After treatment, all of the biofilms were gently washed with distilled water and visualized by AFM and CLSM.

AFM imaging

Samples were imaged in air using an atomic force microscope XE-70 (Park Systems, Korea). All images were collected in non-contact mode using pyramidal-shaped silicon cantilevers with a spring constant of ± 40 N/m, a resonance frequency of ± 300 kHz, and their upper sides coated with aluminum to enhance the reflectivity of the laser beam. AFM images were simultaneously acquired with several scan sizes ($100 \mu\text{m}^2$, $25 \mu\text{m}^2$, and $6.25 \mu\text{m}^2$) at a scan rate of 0.3–0.5 Hz. Data acquired during surface scanning were converted into images of topography, amplitude, and phase and then analyzed using XEP and XEI software (Park Systems, Korea). Topography images reveal the shape and structure of the sample as well as surface differences. Amplitude images highlight the sample outline and allow visualization of fine surface details. Phase images show variations in the elasticity and viscoelasticity of the sample [22].

CLSM imaging

Biofilms on the Thermanox coverslips were washed three times with distilled water to remove loose bacteria and then stained using the LIVE/DEAD *BacLight* bacterial viability kit (Molecular Probes, Eugene, OR). In this system, live bacteria stain with Syto 9 to produce a green fluorescence whereas bacteria with compromised membranes stain with propidium iodide to produce a red fluorescence. Images of the double-stained biofilms were acquired using a Leica TCS-SL filter-free spectral confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with a 488-nm argon laser and 543-nm and 633-nm He/Ne lasers (Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain) and a 63 \times oil immersion objective (1.4 numerical aperture) zoom 1, where the x, y, and z voxel size corresponded to $0.23 \times 0.23 \times 0.4 \mu\text{m}$ with an image resolution of 1024×1024 pixels. The pinhole size was kept at the minimum setting (1.0–1.08 AU). Image saturation was prevented by lowering the gain and offset in the brightest signal. Sequential scanning was carried out for each channel.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Surface roughness

AFM was also used to measure the surface roughness of the treated and untreated biofilms. The roughness average (R_a), defined as the average distance from the roughness profile to the center plane of the profile, was calculated from the acquired topography images for every scan size and treatment.

Bacterial enumeration

The CLSM images were analyzed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) to enumerate viable and dead bacteria, differentially stained as described above. A thresholding procedure was established for every image and a watershed separation was applied to separate clusters of bacteria. Percentages of live and dead bacteria in every treatment were determined.

Results

Visualization of PDT effectiveness

Representative AFM images of treated *E. faecalis* biofilms are shown in Figure 1. An analysis of the AFM topography 3D-images showed that PDT induced severe morphological and surface alterations of the biofilms as well as a broad spectrum of injuries to the resident bacterial cells, whereas in the untreated biofilms *E. faecalis* retained its typical coccoid shape (Fig. 1a). In the biofilms treated with TBO plus LED (30 s), bacterial wall destruction, loss of the typical cell morphology, and leakage of the intracellular contents were observed (Fig. 1f). The injuries to biofilms treated with MB plus diode laser (30 s) were similar (Fig. 1g) but much more apparent. Neither TBO nor MB alone was able to induce noticeable morphological alterations (Fig. 1d, e), as only a small proportion of bacterial cells were even slightly affected. Conversely, light therapy in the absence of the dyes caused slight changes in biofilm topography (Fig. 1b, c).

Surface roughness

Changes in the surface roughness of treated vs. untreated biofilms can be numerically expressed using the XEI software and processing the topography images previously

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

obtained at scan sizes of 25 μm^2 and 6.25 μm^2 . Figure 2 shows the mean surface roughness values (R_a) of control and treated *E. faecalis* biofilms. PDT-treated biofilms had high surface roughness values. By contrast, the roughness values measured after treatment of the biofilms with the dyes or with either light source alone were not significantly modified.

CLSM

Enumeration of the viable and dead bacteria for every treatment showed a significant increase in bacterial death in *E. faecalis* biofilms treated with PDT (Fig. 3). Neither of the photosensitizers alone resulted in significant bacterial killing, as the proportion of living bacteria in either case was identical to that in the negative controls. LED treatment in the absence of photosensitizer had a slightly lethal effect, with approximately 25 % of the individual cells exhibiting red fluorescence. Diode laser treatment alone, at least at the power tested, was unable to kill bacteria. However, PDT, caused significant bacterial injury, with almost 100 % lethality in the case of diode laser plus MB and around 80 % in the case of LED plus TBO.

Representative CLSM images of untreated and PDT-treated biofilms are shown in Fig. 4. On the double-fluorescence images of living plus dead bacteria, the majority of the cells in the untreated biofilms stained green (Fig. 4a), indicating a high level of bacterial viability. In biofilms treated with LED plus TBO (Fig. 4b) or diode laser plus MB (Fig. 4c), most of the bacteria stained red, indicating significant bacterial killing. In these PDT-treated images, orange-staining bacteria were considered to be damaged cells [23].

Discussion

1
2
3
4 In the biofilm mode of growth, microorganisms firmly attached to a surface or interface
5 are enclosed in an extracellular polymeric matrix formed by polysaccharides, nucleic
6 acids, proteins, water, and cell debris. This matrix offers protection against host
7 defenses and often restricts the penetration of antimicrobial agents [1, 24]. Thus, for
8 infections of the oral cavity, in which the causative agents typically reside in biofilms,
9 conventional treatments are often ineffective. A therapeutic approach is therefore
10 needed that focuses on biofilm removal, the eradication of persistent cells, and the
11 decontamination of oral surfaces. PDT has been used to eliminate bacterial as well as
12 cancer cells. Recently, it has emerged as an alternative in the removal of oral biofilms
13 and thus in the prevention or amelioration of infections of the oral cavity.

14
15
16
17
18
19
20
21 In the present work, we used three different approaches, AFM, CLSM, and surface
22 roughness determination, to study the efficacy of PDT in the elimination of *E. faecalis*
23 biofilms formed on Thermanox coverslips. *E. faecalis* is commonly found in the root
24 canal system of the teeth, where its biofilm-type growth has been documented.

25
26
27
28
29 AFM is a powerful tool that, with easy sample preparation, provides high-resolution
30 imaging of microbiological systems [25], individual microbial cells [26], and microbial
31 biofilms [27]. It has also been used to study the mechanical and adhesive properties of
32 microbial cells [25]; to assess surface properties such as roughness, both in air and in
33 liquid [28]; to evaluate morphological effects of treatments, including those targeting
34 microorganisms [29]; and to study microbial cell processes and interactions [30].
35 However, a limitation of AFM is that under physiological conditions some structures
36 and morphological features, such as flagella or biofilm matrix components, are poorly
37 visualized by liquid imaging [26, 31–33] because of deficient adhesion of the microbial
38 cells to the substrate. This, in turn, generates sufficient noise during scanning such that
39 image quality is compromised [34, 35]. In our study, we used air-dried samples since
40 AFM imaging of dried microbial preparations is well established [32, 36]. The
41 advantages include easy sample preparation and high-resolution imaging of microbial
42 cell surfaces [37, 38]. AFM visualizations in air are commonly used to evaluate
43 morphological changes in treated vs. non-treated microbial surfaces [33, 38–43]. Thus,
44 it was the method of choice in the analysis of our air-dried treated and untreated
45 biofilms. Imaging of the latter revealed their normal morphology and low nano-

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 roughness values throughout the incubation period. This result confirmed that the
2 significant morphological alterations and surface injuries observed in the treated
3 samples were produced by PDT and were not sample processing artifacts. Specifically,
4 AFM of the sensitized biofilms revealed that with TBO or MB alone only a small
5 proportion of bacterial cells showed bacterial wall perturbations (Fig. 1d, e). Similar
6 alterations were produced after treatment by light in the absence of dyes (Fig. 1b, c).
7 However, *E. faecalis* biofilms exposed to PDT (Fig. 1f, g), and particularly those treated
8 with MB and diode laser, showed severe alterations.
9

10 A relevant parameter to characterize surface morphology is the determination of surface
11 roughness, expressed as the arithmetic average roughness R_a [44]. An increase in cell
12 surface roughness is indicative of a distorted cell morphology, bacterial wall
13 destruction, and leakage of cellular contents, all of which were observed in the PDT-
14 treated biofilms, thus confirming the AFM findings. The surface roughness data also
15 showed that the greatest damage occurred in biofilms exposed to MB and diode laser
16 (Fig. 2). In irradiated cells, photosensitizers may cause alterations to membrane
17 integrity and thus also damage cytoplasmic components [45]. These results support the
18 use of PDT to destroy *E. faecalis* biofilms.
19

20 CLSM was used to assess bacterial viability in biofilms subjected to PDT or to the
21 photosensitizers or light alone and it confirmed our AFM results. With the double-
22 staining method, we were able to distinguish between bacteria with intact (green) and
23 damaged (red/orange) membranes [23]. CLSM images of the untreated biofilm showed
24 that most of the bacteria stained green, indicating their viability (Fig. 4a) whereas the
25 large proportion of red-staining bacteria in the PDT-treated biofilms confirmed the
26 efficacy of this form of treatment (Fig. 4b, c).
27

28 Similar results were obtained in previous studies in which the PDT-induced damage to
29 microbial surfaces was assessed. Sahu *et al.* (2009) [40] used AFM to visualize the
30 topographical alterations produced by TBO-mediated PDT in *Staphylococcus aureus*
31 and *Escherichia coli*. They observed perturbations to the bacterial wall, bleb formations
32 suggestive of damage to membrane components, and an increase in cell surface
33 roughness. Cheng *et al.* (2012) [8] evaluated the bactericidal effect of several different
34 laser irradiation methods and PDTs in root canals experimentally infected with *E.*
35 *faecalis*, using scanning electron microscopy (SEM) to examine the morphology of
36 bacterial cells before and after treatment. SEM revealed the shrunken, rough, and
37 fractured appearance of the bacterial cells that remained after PDT. Melo *et al.* (2013)
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[46] used AFM to examine the PDT-induced changes in the shape and size of *Streptococcus mutans* cells. The combination of TBO and LED resulted in a decrease in the diameter of the bacterial cells.

The severe perturbations of *E. faecalis* biofilms produced by PDT recommend its use in the eradication of bacterial biofilms. Nevertheless, further studies that include supplemental measuring techniques are needed to explore the effect of PDT on the integrity of microbial biofilms. In addition, whether PDT is equally effective when used on biofilms formed by other microbial species or complex microbial communities remains to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Centres Científics i Tecnològics (Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, Barcelona, Spain) and particularly Dr. Benjamin Torrejón for their technical assistance in CLSM.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

1. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–193.
2. Soukos NS, Goodson JM (2011) Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000 55:143–166.
3. Rosan B, Lamont RJ (2000) Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2:1599–1607.
4. Marsh PD (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6:7–15.
5. Dötsch A, Eckweiler D, Schniederjans M, et al. (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *PLoS One* 7:e31092. doi: 10.1371/journal.pone.0031092
6. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Discov* 2:114–122.
7. Konopka K, Goslinski T (2007) Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 86:694–707.
8. Cheng X, Guan S, Lu H, et al. (2012) Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med* 44:824–831.
9. Maisch T, Hackbarth S, Regensburger J, et al. (2011) Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *J Dtsch Dermatol Ges* 9:360–366.
10. Odor TM, Watson TF, Pitt Ford TR, McDonald F (1996) Pattern of transmission of laser light in teeth. *Int Endod J* 29:228–234.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

11. Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, et al. (2000) Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg* 18:57–60.

12. Schoop U, Kluger W, Moritz A, et al. (2004) Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med* 35:111–116.

13. Bahcall J, Howard P, Miserendino L, Walia H (1992) Preliminary investigation of the histological effects of laser endodontic treatment on the periradicular tissues in dogs. *J Endod* 18:47–51.

14. Turkmen C, Gunday M, Karacorlu M, Basaran B (2000) Effect of CO₂, Nd:YAG, and ArF excimer lasers on dentin morphology and pulp chamber temperature: an in vitro study. *J Endod* 26:644–648.

15. Nunes MR, Mello I, Franco GC, et al. (2011) Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. *Photomed Laser Surg* 29:803–808.

16. Lee MT, Bird PS, Walsh LJ (2004) Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. *Aust Endod J* 30:93–98.

17. Wainwright M, Crossley KB (2004) Photosensitising agents—circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegradation* 53:119–126.

18. Rios A, He J, Glickman GN, et al. (2011) Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod* 37:856–859.

19. Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R, et al. (2012) Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. *Dent Res J* 9:613–618.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

20. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ (2006) Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent* 34:363–371.

21. Garcez AS, Nunez SC, Hamblim MR, et al. (2010) Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod* 36:1463–1466.

22. Dorobantu LS, Bhattacharjee S, Foght JM, Gray MR (2008) Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir* 24:4944–4951.

23. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, et al. (1999) LIVE/DEAD® *BacLight*™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37:77–86.

24. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322.

25. Dorobantu LS, Goss GG, Burrell RE (2012) Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron* 43:1312–1322.

26. Gillis A, Dupres V, Delestrait G, et al. (2012) Nanoscale imaging of *Bacillus thuringiensis* flagella using atomic force microscopy. *Nanoscale* 4:1585–1591.

27. Díaz C, Schilardi PL, Salvarezza RC, Fernández Lorenzo de Mele M (2011) Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates. *Colloids Surf B Biointerfaces* 82:536–542.

28. Andre G, Deghorain M, Bron PA, et al. (2011) Fluorescence and atomic force microscopy imaging of wall teichoic acids in *Lactobacillus plantarum*. *ACS Chem Biol* 6:366–376.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

29. Francius G, Domenech O, Mingeot-Leclercq MP, Dufrêne YF (2008) Direct observation of *Staphylococcus aureus* cell wall digestion by lysostaphin. *J Bacteriol* 190:7904–7909.

30. Muller DJ, Krieg M, Alsteens D, Dufrene YF (2009) New frontiers in atomic force microscopy: analyzing interactions from single-molecules to cells. *Curr Opin Biotechnol* 20:4–13.

31. Bolshakova A V, Kiselyova OI, Yaminsky I V (2004) Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy. *Biotechnol Prog* 20:1615–1622.

32. Núñez ME, Martin MO, Chan PH, et al. (2005) Atomic Force Microscopy of Bacterial Communities. *Methods Enzymol* 397:256–268.

33. Silva Junior A, Teschke O (2005) Dynamics of the Antimicrobial Peptide PGLa Action on *Escherichia coli* Monitored by Atomic Force Microscopy. *World J Microbiol Biotechnol* 21:1103–1110.

34. Bolshakova A V, Kiselyova OI, Filonov AS, et al. (2001) Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy* 86:121–128.

35. Robichon D, Girard JC, Cenatiempo Y, Cavellier JF (1999) Atomic force microscopy imaging of dried or living bacteria. *C R Acad Sci III* 322:687–693.

36. Núñez ME, Martin MO, Chan PH, Spain EM (2005) Predation, death, and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 42:263–271.

37. Jonas K, Tomenius H, Kader A, et al. (2007) Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol* 7:70.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

38. Rossetto G, Bergese P, Colombi P, et al. (2007) Atomic force microscopy evaluation of the effects of a novel antimicrobial multimeric peptide on *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanomedicine* 3:198–207.

39. Canetta E, Walker GM, Adya AK (2009) Nanoscopic Morphological Changes in Yeast Cell Surfaces Caused by Oxidative Stress: An Atomic Force Microscopic Study. *J Microbiol Biotechnol* 19:547–555.

40. Sahu K, Bansal H, Mukherjee C (2009) Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol Biol* 96:9–16.

41. Liu S, Ng AK, Xu R, et al. (2010) Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale* 2:2744–2750.

42. Fernandes JC, Eaton P, Gomes AM, et al. (2009) Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy* 109:854–860.

43. Deupree SM, Schoenfisch MH (2009) Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on Gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomater* 5:1405–1415.

44. Botta SB, Ana PA, de Sa Teixeira F, et al. (2011) Relationship between surface topography and energy density distribution of Er,Cr:YSGG beam on irradiated dentin: an atomic force microscopy study. *Photomed Laser Surg* 29:261–269.

45. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, et al. (1998) A Study of the Uptake of Toluidine Blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the Mechanism of Lethal Photosensitization. *Photochem Photobiol* 68:370–376.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

46. De Melo MA, Rolim JP, Zanin IC, et al. (2013) Characterization of Antimicrobial Photodynamic Therapy-Treated *Streptococci mutans*: An Atomic Force Microscopy Study. Photomed Laser Surg 31:105–109.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 1 AFM 3D topography images of *E. faecalis* biofilms: untreated (a), exposed to LED for 30 s (b), exposed to diode laser for 30 s (c), sensitized 1 min with TBO (d), sensitized 1 min with MB (e), sensitized 1 min with TBO and exposed to LED for 30 s (f), and sensitized 1 min with MB and exposed to diode laser for 30 s (g). Scan size = 25 μm^2

Fig. 2 Graphical representation of surface roughness (R_a) in nanometers, according to the different treatments tested and surface scan sizes. Bars represent the standard error of the mean. The mean surface roughness values are shown in the table below

Fig. 3 Graphical representation of living and dead bacteria, according to the different treatments tested. Bars represent the standard error of the mean

Fig. 4 CLSM images of *E. faecalis* biofilms: untreated (a), treated with LED plus TBO (b), and treated with diode laser plus MB (c). Left: viable (green) bacteria; middle: dead (red) bacteria; right: viable and dead bacteria. Scale bar = 10 μm

Figure1
[Click here to download high resolution image](#)

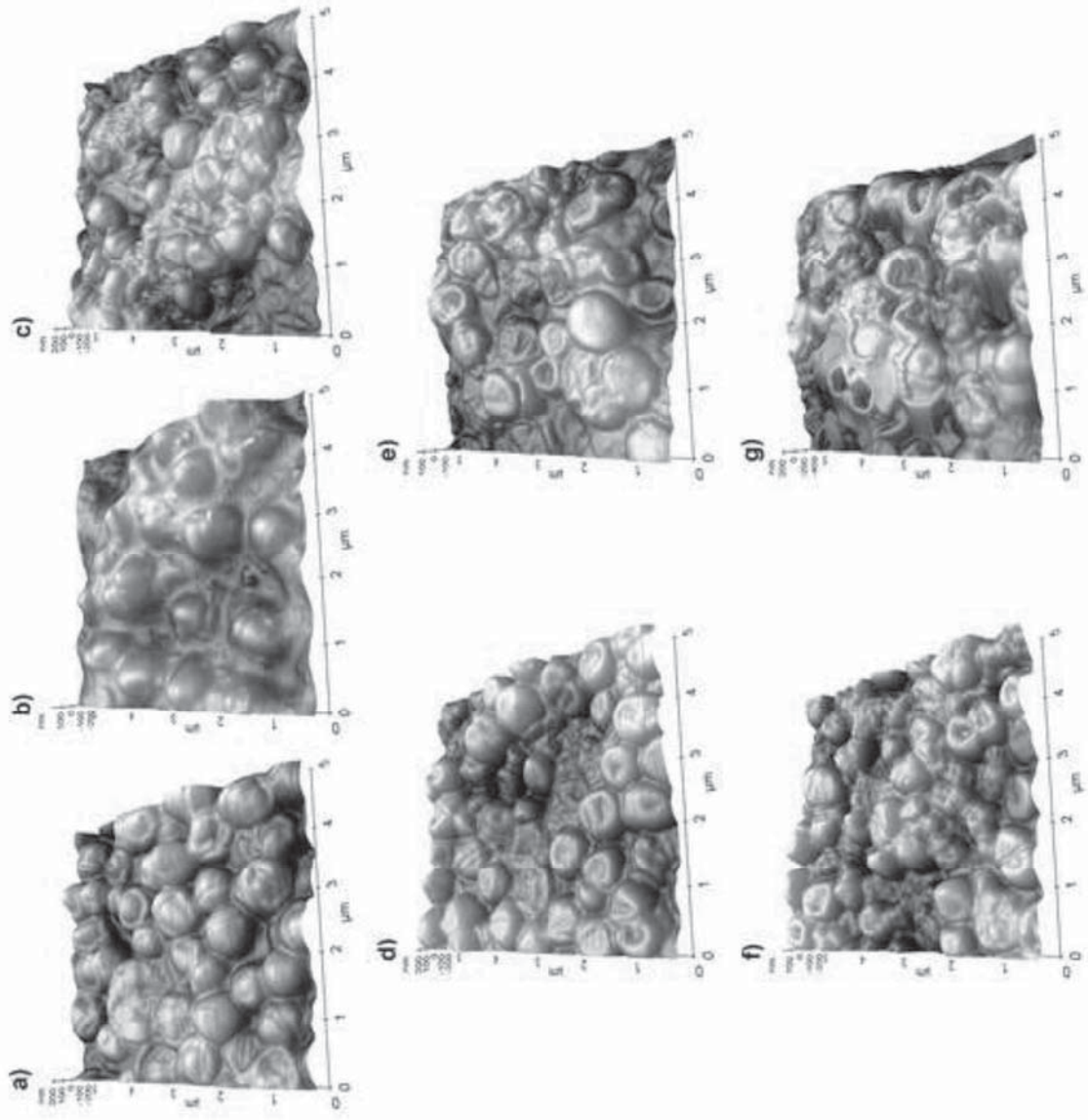


Figure2
[Click here to download high resolution image](#)

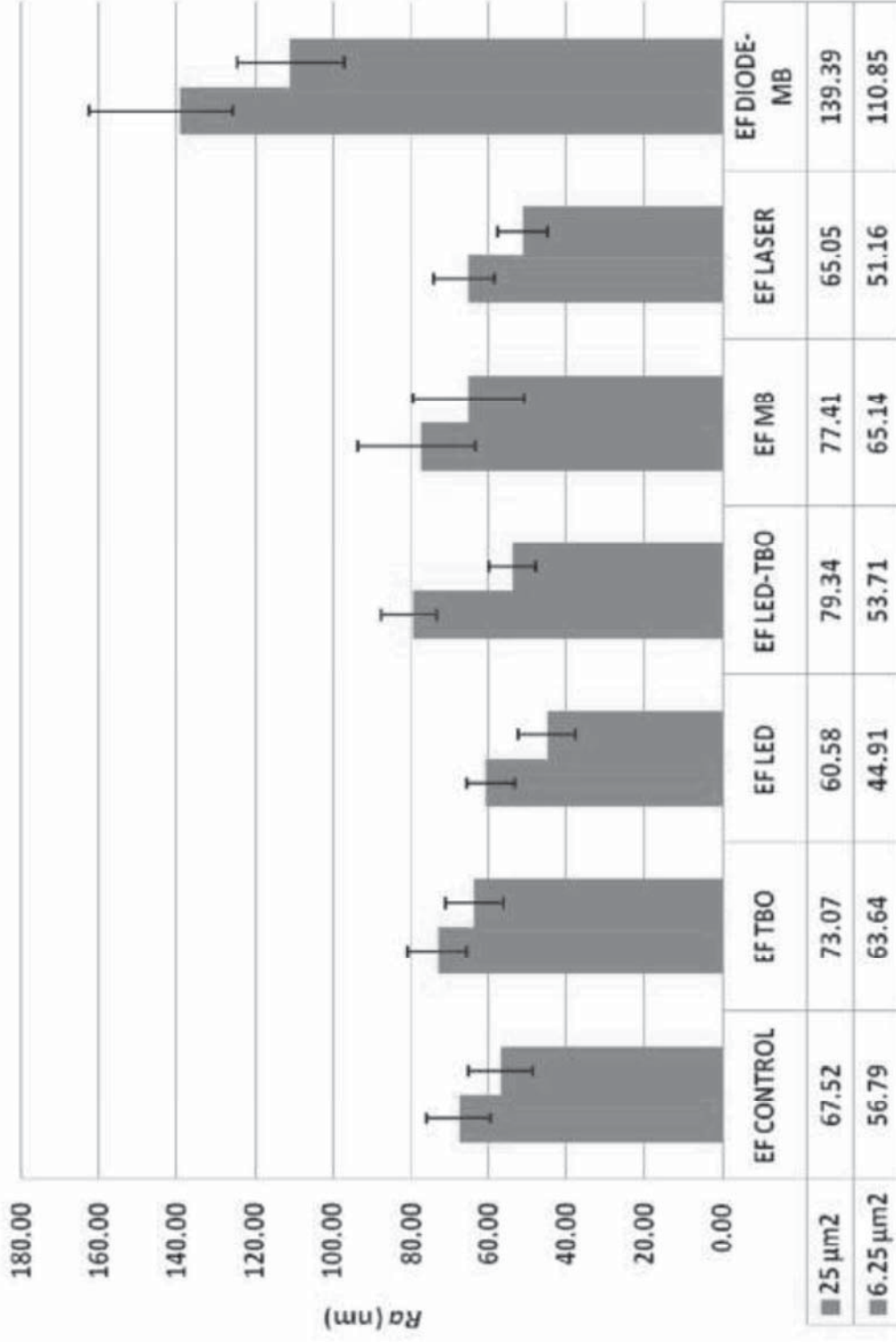


Figure
Click here to download Figure: Figure 3.docx

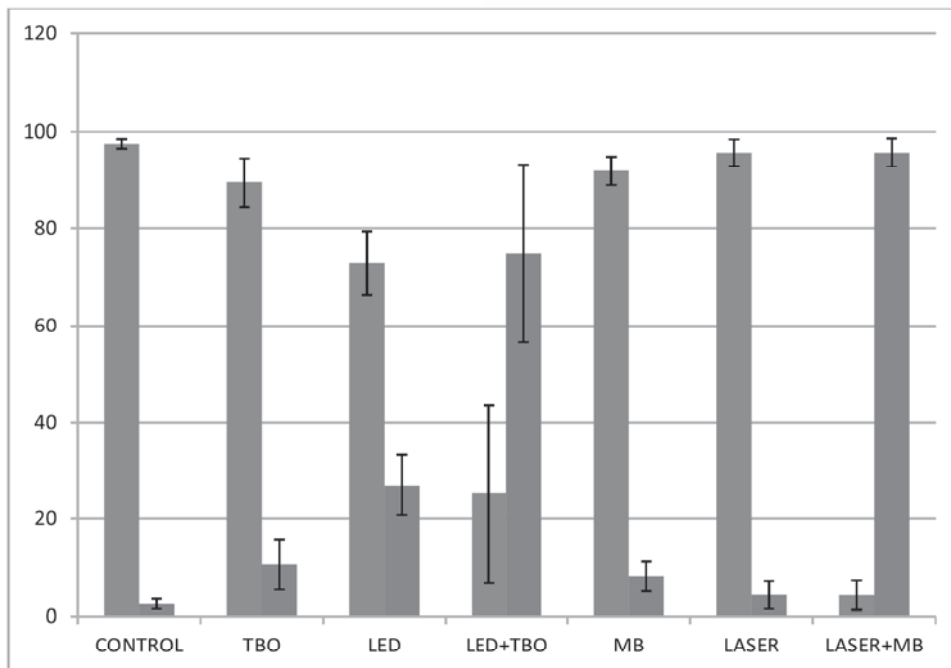


Figure 3.

Figure4
[Click here to download high resolution image](#)

