

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica

Mayra Alexandra Téllez Corral

Avaliação da atividade antimicrobiana da Lactoferricina B (LfcinB) e Anfotericina B (AMB) em sistemas de liberação controlada em biofilmes polimicrobianos *in vitro* relacionados à Periodontite associada à Apneia Obstrutiva do Sono

Belo Horizonte
2022

Mayra Alexandra Téllez Corral

Avaliação da atividade antimicrobiana da Lactoferricina B (LfcinB) e Anfotericina B (AMB) em sistemas de liberação controlada em biofilmes polimicrobianos *in vitro* relacionados à Periodontite associada à Apneia Obstrutiva do Sono

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Inovação Tecnológica.

Orientadora: Profa. Maria Esperanza Cortés Segura e Claudia Parra Giraldo.

Coorientadoras: Nelly Stella Roa Molina e Liliana Margarita Otero Mendoza.

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

T626e
2022
T

Téllez Corral, Mayra Alexandra.

Avaliação da atividade antimicrobiana da lactoferricina B (LfcinB) e da anfotericina B (AMB) em sistemas de liberação controlada em biofilmes polimicrobianos in vitro relacionados à periodontite associada à apneia obstrutiva do sono [manuscrito] / Mayra Alexandra Téllez Corral. 2022.

1 recurso online (199 f. : il., gráfs., tabs., color.) : pdf.

Orientadoras: María Esperanza Cortés Segura e Claudia Parra Giraldo.

Coorientadoras: Nelly Stella Roa Molina e Liliana Margarita Otero Mendoza.

Outro título: Evaluación de la actividad antimicrobiana de lactoferricina B (LfcinB) y anfotericina B (AMB) en sistemas de liberación controlada sobre biopelículas polimicrobianas in vitro relacionadas a la periodontitis asociada a apnea obstructiva del sueño.

Esta tese contém 4 (quatro) artigos em inglês.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química (Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica em convênio de cotutela com a Pontificia Universidad Javeriana - Facultad de Ciencias).

Bibliografia: f. 174-188.

Anexos: f. 189-199.

1. Inovações tecnológicas – Teses. 2. Periodontite – Teses. 3. Síndrome das apneias do sono – Teses. 4. Biofilme – Teses. 5. Produtos de ação antimicrobiana – Teses. 6. Anfotericina B – Teses. 7. Compostos de zinco – Teses. 8. Agentes antiinflamatórios – Teses. 9. Preparações de liberação controlada – Teses. I. Cortés Segura, María Esperanza, Orientadora. II. Parra Giraldo, Claudia, Orientadora. III. Roa Molina, Nelly Stella, Coorientadora. IV. Otero Mendoza, Liliana Margarita, Coorientadora. V. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 28ª TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, DA DISCENTE MAYRA ALEXANDRATÉLLEZ CORRAL, Nº DE REGISTRO 2020740952.

Aos 27 (vinte e sete) dias do mês de janeiro de 2023, às 10 horas, online via plataforma virtual Zoom, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos Professores Doutores: María Esperanza Cortés Segurado Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica da UFMG (Orientadora pela UFMG), Cláudia Marcela Parra Giraldo (Orientadora pela Pontificia Universidad Javeriana), Nelly Stella Roa Molina (Co-orientadora pela Pontificia Universidad Javeriana), Liliana Margarita Otero Mendoza (Co-orientadora pela Pontificia Universidad Javeriana) e Maria Arantxazu Llama Palacios da Universidad Complutense de Madrid, Octavio Alberto González Duque da University of Kentucky College of Medicine, Adolfo Contreras da Universidad del Valle, Carlos Javier Almeciga Díaz da Pontificia Universidad Javeriana e Soraia Macari da Universidade Federal de Minas Gerais, para julgamento da Tese de Doutorado em Inovação Tecnológica - Área de Concentração: Inovação Biofarmacêutica e Biotecnológica da discente Mayra Alexandra Téllez Corral, Tese intitulada: **“Avaliação da atividade antimicrobiana da Lactoferrina B (LfcrinB) e da Anfotericina B (AMB) em sistemas de liberação controlada em biofilmes polimicrobianos in vitro relacionados à periodontite associada à apneia obstrutiva do sono”**. A presente defesa foi elaborada de acordo com o Convênio de Co-tutela 0790709 SEI 23072.207933 estabelecido entre a Universidade Federal de Minas Gerais e a Pontificia Universidad Javeriana. A Presidente da Banca abriu a sessão e apresentou a Comissão Examinadora, bem como esclareceu sobre os procedimentos que regem da defesa pública de tese. Após a exposição oral do trabalho pela discente e arguição pelos membros da Banca Examinadora na ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da discente e do público, tendo deliberado unanimemente pela sua **APROVAÇÃO**. Nada mais havendo para constar, lavrou-se e fez a leitura pública da presente Ata que segue assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora e pelo subcoordenador do Programa. Belo Horizonte, 27 de janeiro de 2023.

Professora Cláudia Marcela Parra Giraldo (Orientadora)
(Pontificia Universidad Javeriana)

Professora Doutora María Esperanza Cortés Segura (Orientadora)(PPG em Inovação Tecnológica da UFMG)

Professora Doutora Nelly Stella Roa Molina (Co-orientadora)(Pontificia Universidad Javeriana)

Professora Doutora Liliana Margarita Otero Mendoza (Co-orientadora)(Pontificia Universidad Javeriana)

Professora Doutora Maria Arantxazu Llama Palacios
(Universidad Complutense de Madrid)

Professor Doutor Octavio Alberto González Duque
(University of Kentucky College of Medicine)

Professor Doutor Adolfo Contreras
(Universidad del Valle)

Professor Doutor Carlos Javier Almeciga Diaz
(Pontificia Universidad Javeriana)

Professora Doutora Soraia Macari
(Universidade Federal de Minas Gerais)

Professor Doutor Allan Claudius Queiroz Barbosa
Subcoordenador do PPG em Inovação Tecnológica da UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Maria Esperanza Cortes Segura, Professora do Magistério Superior**, em 31/01/2023, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraia Macari, Professora do Magistério Superior**, em 01/02/2023, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2208070&infra_sistema...

Documento assinado eletronicamente por **María Arantxazu Llama Palacios, Usuária Externa**, em 03/02/2023, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Javier Almeciga Diaz, Usuário Externo**, em 13/02/2023, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Octavio Alberto Gonzalez Duque, Usuário Externo**, em 20/02/2023, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Liliana Otero Mendoza, Usuário Externo**, em 23/02/2023, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nelly Stella Roa Molina, Usuária Externa**, em 27/02/2023, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Marcela Parra Giraldo, Usuário Externo**, em 08/03/2023, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Contreras Rengifo, Usuário Externo**, em 24/03/2023, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Allan Claudius Queiroz Barbosa, Coordenador(a) de cursode pós-graduação**, em 25/03/2023, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2050810** e o código CRC **8A929ECE**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica

“Avaliação da atividade antimicrobiana da Lactoferrina B (LfcinB) e da Anfotericina B (AMB) em sistemas de liberação controlada em biofilmes polimicrobianos in vitro relacionados à periodontite associada à apneia obstrutiva do sono.”

MAYRA ALEXANDRA TÉLLEZ CORRAL, Nº DE REGISTRO 2020740952.

Tese **Aprovada** pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores: Professora

Doutora Cláudia Marcela Parra Giraldo (Orientadora)

(Pontificia Universidad Javeriana)

Professora Doutora María Esperanza Cortés Segura (Orientadora)(PPG em Inovação Tecnológica da UFMG)

Professora Doutora Nelly Stella Roa Molina (Co-orientadora)(Pontificia Universidad Javeriana)

Professora Doutora Liliana Margarita Otero Mendoza (Co-orientadora)(Pontificia Universidad Javeriana)

Professora Doutora Maria Arantxazu Llama Palacios
(Universidad Complutense de Madrid)

Professor Doutor Octavio Gonzalez Duque
(University of Kentucky College of Medicine)

Professor Doutor Adolfo Contreras
(Universidad del Valle)

Professor Doutor Carlos Javier Almeciga Diaz
(Pontificia Universidad Javeriana)

Professora Doutora Soraia Macari
(Universidade Federal de Minas Gerais)

Professor Doutor Allan Claudius Queiroz Barbosa
Subcoordenador do PPG em Inovação Tecnológica da UFMG

Belo Horizonte, 27 de janeiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Esperanza Cortes Segura, Professora do Magistério Superior**, em 31/01/2023, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraia Macari, Professora do Magistério Superior**, em 01/02/2023, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **María Arantxazu Llama Palacios, Usuária Externa**, em 03/02/2023, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Javier Almeciga Diaz, Usuário Externo**, em 13/02/2023, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Octavio Alberto Gonzalez Duque, Usuário Externo**, em 20/02/2023, às 10:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Liliana Otero Mendoza, Usuário Externo**, em 23/02/2023, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nelly Stella Roa Molina, Usuária Externa**, em 27/02/2023, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Marcela Parra Giraldo, Usuária Externa**, em 08/03/2023, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Contreras Rengifo, Usuário Externo**, em 24/03/2023, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Allan Claudius Queiroz Barbosa, Professor do Magistério Superior**, em 25/03/2023, às 12:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2050821** e o código CRC **FA270454**.

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Doutorado em Inovação Tecnológica



Evaluación de la actividad antimicrobiana de Lactoferricina B (LfcinB) y Anfotericina B (AMB) en sistemas de liberación controlada sobre biopelículas polimicrobianas *in vitro* relacionadas a la Periodontitis asociada a Apnea Obstructiva del Sueño

Mayra Alexandra Téllez Corral

Tesis doctoral

Directora

Dra. Claudia Marcela Parra Giraldo

Directora

Dra. María Esperanza Cortés Segura

Co-directoras

Dra. Nelly Stella Roa Molina

Dra. Liliana Margarita Otero Mendoza

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Doutorado em Inovação Tecnológica



Evaluación de la actividad antimicrobiana de Lactoferricina B (LfciB) y Anfotericina B (AMB) en sistemas de liberación controlada sobre biopelículas polimicrobianas *in vitro* relacionadas a la Periodontitis asociada a Apnea Obstructiva del Sueño

Mayra Alexandra Téllez Corral

Tesis doctoral

Jurados

Dr. Octavio Alberto González

LLAMA
PALACIOS MARIA
ARANTXAZU -
00827897N

Firmado digitalmente por LLAMA
PALACIOS MARIA ARANTXAZU -
00827897N
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-00827897N,
givenName=MARIA ARANTXAZU,
sn=LLAMA PALACIOS, cn=LLAMA
PALACIOS MARIA ARANTXAZU -
00827897N
Fecha: 2023.02.13 22:07:32 +01'00'

Dra. María Arantzazu Llama Palacios

Dra. Soraia Macari

Dr. Adolfo Contreras

Dr. Carlos Javier Almeciga

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas



Evaluación de la actividad antimicrobiana de Lactoferricina B (LfcinB) y Anfotericina B (AMB) en sistemas de liberación controlada sobre biopelículas polimicrobianas *in vitro* relacionadas a la Periodontitis asociada a Apnea Obstructiva del Sueño

Mayra Alexandra Téllez Corral
Tesis doctoral

Dr. Jhon Jairo Sutachan Rubio
Director de Posgrados
Facultad de Ciencias

Dra. Alba Alicia Trespacios
Decana
Facultad de Ciencias

OBSERVAÇÃO

Esta tese doutoral foi realizada tendo em conta as bases estabelecidas no Acordo de Cooperação para a co-orientação de teses de doutoramento conducentes ao duplo grau de doutor celebrado entre as universidades Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, da Colômbia e pela Universidade Federal de Minas Gerais do Brasil.

*Dedicada a mi familia,
especialmente a mi madre, **Prudencia Corral***

AGRADECIMIENTOS

Definitivamente realizar un doctorado es todo un reto, no solo profesional, sino también personal y familiar, que hace que sea una de las experiencias más significativas en la vida. Este proceso académico que lleve a cabo, trajo consigo enseñanzas, lecciones, mucho conocimiento y también excelentes personas, que ayudaron con su granito de arena, para que hoy yo logrará la meta, ser una doctora.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras Ma. Esperanza Cortés, Claudia Parra, Nelly Roa y Liliana Otero, por haber aceptado este reto conmigo, por darme la mano y guiarme en cada momento, por el apoyo y la confianza que me dieron y, sobre todo, por dar lo mejor de sí mismas para sacar lo mejor de mí. Estoy muy orgullosa y admiro mucho su labor como mujeres en la ciencia, espero algún día llegar a ser tan grande como ustedes.

También quiero agradecer al Profe. Ruben Sinisterra porque me abrió las puertas de su laboratorio y grupo LEMB. Gracias porque me mostró otros horizontes y me enseñó que el cielo es el límite de todo lo que nos proponemos.

A Jean Carlos Villamil y a Sergio Bonilla por su ayuda, apoyo, por el ánimo de cada día, y sobre todo por su amistad incondicional.

A Maye Carvajal, Angelita Hernandez y Ma. Victoria Hernandez, gracias por su apoyo, amistad y buena energía. Fueron parte importante en este proceso.

A mis compañeros del grupo LEMB y LBM de la UFMG, que se convirtieron en amigos. A Alfonso Martinez por compartir su conocimiento, por aconsejarme, enseñarme y darme la mano en los momentos más difíciles. A Manuel Ramirez y Lida Arias por enseñarme el mundo de la química y mostrarme la generosidad al compartir sus conocimientos. A Manuela Puerta, Daniela Motta, Alix Bastidas y Gustavo Cifuentes por su apoyo y amistad. Gracias a todos porque me hicieron sentir en casa e hicieron más feliz mi estancia en Brasil.

A mi familia por su paciencia, por el apoyo emocional, por ser el motor que me impulsa a ser mejor cada día y por apoyarme en cada proyecto que emprendo.

Finalmente, pero no menos importante, un sincero agradecimiento a las instituciones que permitieron que este trabajo fuera posible: A la Pontificia Universidad Javeriana, Universidad Federal de Minas Gerais, Hospital Universitario San Ignacio, Banco de la República y Fundación L'Oreal.

"La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Debemos tener perseverancia y sobre todo confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que eso se debe lograr".

"A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Devemos ter perseverança e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos dotados para algo e que isso deve ser alcançado."

Marie Curie

Resumo

Avaliação da atividade antimicrobiana da Lactoferricina B (LfcinB) e da Anfotericina B (AMB) em sistemas de liberação controlada em biofilmes polimicrobianos *in vitro* relacionados à periodontite associada à apneia obstrutiva do sono

A periodontite é uma doença altamente prevalente, sendo uma das seis doenças humanas mais comuns. A presença de uma microbiota disbiótica é considerada um fator predisponente devido à capacidade de formar biofilmes, que por sua vez causam uma resposta inflamatória crônica local. O grau de envolvimento pode variar entre os indivíduos devido à suscetibilidade genética e ao estilo de vida. Algumas doenças sistêmicas, como a apneia obstrutiva do sono (AOS), podem aumentar o risco de desenvolvimento e progressão da periodontite. A AOS é um distúrbio do sono que obstrui as vias aéreas, impedindo a passagem do ar. De acordo com as diferentes hipóteses sobre o aumento da periodontite em indivíduos com AOS, pode ser devido a causas como predisposição genética, devido à resposta inflamatória compartilhada por ambas as condições e/ou devido às características fisiopatológicas da AOS, como ressecamento oral, hipóxia e hipercapnia. Todos esses fatores podem ser considerados um risco significativo na persistência da periodontite em indivíduos com AOS. A fim de propor uma alternativa terapêutica para o tratamento da periodontite relacionada à AOS, o primeiro objetivo deste trabalho baseou-se em estabelecer a associação entre ambas as condições, através do papel da microbiota e da resposta inflamatória local, a partir da identificação de microrganismos cultiváveis e quantificação de cinco citocinas pró-inflamatórias em amostras da cavidade oral de 94 indivíduos com e sem periodontite, com e sem AOS, provenientes da Clínica do Sono do Hospital Universitário San Ignacio e da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Javeriana. A partir da identificação microbiana por MALDI-TOF e da quantificação de citocinas pelo ensaio Luminex, determinou-se que a microbiota oral cultivável de pacientes com periodontite e OSA, estava alterada em termos de diversidade, associada à presença de bactérias de complexos laranja, como *Prevotella* spp. e leveduras do gênero *Candida* spp., sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente, e os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-17A e IL-33 foram aumentados, com a presença de *Candida* spp. os níveis de IL-17A e IL-33 foram aumentados. A partir do perfil microbiano de indivíduos com Periodontite e AOS, nove bactérias e *C. albicans* foram selecionadas, isoladas e cultivadas para estabelecer um modelo de biofilme polimicrobiano *in vitro*, com o qual foi avaliado o efeito anti-biofilme de nanofibras carregadas com Anfotericina B (AMB), um peptídeo antimicrobiano palindrômico; Lactoferricina B (LfcinB (21-25)_{pal}) e/ou Óxido de Zinco (ZnO). Da mesma forma, foram avaliados o efeito citotóxico e as características físico-químicas das nanofibras. Foi determinado que as nanofibras eram biocompatíveis apresentando uma viabilidade celular superior a 50% dos fibroblastos do ligamento periodontal humano. A nanofibra com AMB, LfcinB (21-25)_{pal} e ZnO (Nf 6) apresentou maior inibição, tempo-dependente, do biofilme polimicrobiano *in vitro*, demonstrando a capacidade do AMB em inibir bactérias, juntamente com LfcinB (21-25)_{pal} e ZnO aumentando a atividade anti-biofilme. A nanofibra Nf 6 exibiu boa estabilidade mecânica e térmica, foi fácil de manusear, teve uma distribuição homogênea do diâmetro da fibra e foi de natureza hidrofílica. Por fim, foi realizado um levantamento tecnológico do uso dessas nanofibras. Este estudo de prospecção de tecnologia demonstrou que esta nanofibra pode ser uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento da periodontite associada à AOS, portanto, esta nanofibra é proposta como uma tecnologia possivelmente patenteável.

Palavras-chave: Periodontite, Apneia Obstrutiva do Sono, biofilmes polimicrobianos, anfotericina B, Lactoferricina B, ZnO, Nanofibras.

Resumen

Evaluación de la actividad antimicrobiana de Lactoferricina B (LfcinB) y Anfotericina B (AMB) en sistemas de liberación controlada sobre biopelículas polimicrobianas *in vitro* relacionadas a la periodontitis asociada a apnea obstructiva del sueño

La periodontitis es una enfermedad de alta prevalencia siendo una de las seis enfermedades humanas más comunes. La presencia de una microbiota disbiótica se considera un factor predisponente por la capacidad de formar biopelículas, que a su vez provocan una respuesta inflamatoria crónica local. El grado de afectación puede variar entre los individuos debido a susceptibilidad genética y a estilos de vida. Algunas enfermedades sistémicas, como la apnea obstructiva del sueño (AOS), puede aumentar el riesgo de desarrollo y progresión de la periodontitis. La AOS es un trastorno respiratorio del sueño que obstruye la vía aérea impidiendo el paso de aire. De acuerdo a las diferentes hipótesis sobre el aumento de la periodontitis en individuos con AOS, puede ser por causas como la predisposición genética, por la respuesta inflamatoria compartida por ambas condiciones y/o por las características fisiopatológicas de la AOS, como la sequedad oral, la hipoxia y la hipercapnia. Todos estos factores pueden considerarse un riesgo significativo en la persistencia de la periodontitis en individuos con AOS. Con el fin de plantear una alternativa terapéutica para el tratamiento de la periodontitis relacionada a la AOS, el primer objetivo de este trabajo se basó en establecer la asociación entre ambas condiciones, mediante el papel de la microbiota y la respuesta inflamatoria local, a partir de la identificación de microorganismos cultivables y cuantificación de cinco citocinas proinflamatorias en muestras de cavidad oral de 94 individuos mayores de 30 años, con y sin Periodontitis, con y sin AOS, provenientes de la Clínica del sueño del Hospital Universitario San Ignacio y de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana. A partir de la identificación microbiana por MALDI-TOF y la cuantificación de citocinas por el ensayo de Luminex, se determinó que la microbiota oral cultivable de los pacientes con periodontitis y AOS, se alteró en términos de diversidad, asociada a la presencia de bacterias de los complejos naranja, como *Prevotella* spp. y levaduras del género *Candida* spp., siendo *C. albicans* la especie más prevalente, y los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-17A e IL -33 se aumentaron, teniendo relación la presencia de *Candida* spp. con el aumento de los niveles de IL-17A y IL-33. A partir del perfil microbiano de los individuos con Periodontitis y AOS, se seleccionaron, aislaron y cultivaron nueve bacterias y *C. albicans* para establecer un modelo de biopelícula polimicrobiana *in vitro*, con el cual se evaluó el efecto anti-biopelícula de nanofibras cargadas con Anfotericina B (AMB), un péptido antimicrobiano palindrómico; Lactoferricina B (LfcinB (21-25)_{pal}) y/o Óxido de Zinc (ZnO). De igual forma se evaluó el efecto citotóxico y las características fisicoquímicas de las nanofibras. Se determinó que las nanofibras fueron biocompatibles mostrando una viabilidad celular mayor del 50% de fibroblastos del ligamento periodontal humano. La nanofibra con AMB, LfcinB (21-25)_{pal} y ZnO (Nf 6) mostró mayor inhibición, tiempo-dependiente, de la biopelícula polimicrobiana *in vitro*, demostrando la capacidad de AMB de inhibir bacterias, junto a la LfcinB (21-25)_{pal} y el ZnO aumentando la actividad anti-biopelícula. La nanofibra Nf 6 exhibió buena estabilidad mecánica y térmica, de fácil manipulación, con una distribución de diámetro de fibra homogénea, y de naturaleza hidrofílica. Finalmente, una prospección tecnológica del uso de estas nanofibras fue realizada. Este estudio de prospección tecnológica demostró que esta nanofibra puede ser una alternativa terapéutica promisoriosa para el tratamiento de la periodontitis asociada a la AOS, por lo tanto, se propone esta nanofibra como una tecnología posiblemente patentable.

Palabras clave: Periodontitis, Apnea Obstructiva del Sueño, biopelículas polimicrobianas, anfotericina B, Lactoferricina B, ZnO, nanofibras

Abstract

Evaluation of the antimicrobial activity of Lactoferricin B (LfcinB) and Amphotericin B (AMB) in controlled release systems on polymicrobial biofilms *in vitro* related to periodontitis associated with obstructive sleep apnea

Abstract

Periodontitis is a highly prevalent disease, being one of the six most common human diseases. Due to its capacity to create biofilms, a dysbiotic microbiota is considered as a predisposing factor since it might result in a localized, chronic inflammatory response. The degree of involvement may vary between individuals due to genetic susceptibility and lifestyle. Some systemic diseases, such as obstructive sleep apnea (OSA), can increase the risk of development and progression of periodontitis. OSA is a sleep disorder that obstructs the airway, preventing the passage of air. The increase in periodontitis in individuals with OSA may be caused by a variety of factors, including genetic susceptibility, an inflammatory response that both conditions share, and/or pathophysiological features of OSA such oral dryness, hypoxia, and hypercapnia. All these factors can be considered a significant risk in the persistence of periodontitis in individuals with OSA. In order to propose a therapeutic alternative for the treatment of OSA-related periodontitis, the first objective of this study was based on establishing the association between both conditions, through the role of the microbiota and the local inflammatory response, based on the identification of cultivable microorganisms and quantification of five proinflammatory cytokines in samples from the oral cavity of 94 individuals over 30 years of age, with and without Periodontitis, with and without OSA, from the Sleep Clinic of the San Ignacio University Hospital and the School of Dentistry from the Pontificia Universidad Javeriana. From the microbial identification by MALDI-TOF and the quantification of cytokines by the Luminex assay, it was determined that the culturable oral microbiota of patients with periodontitis and OSA, was altered in terms of diversity, associated with the presence of bacteria of orange complexes, such as *Prevotella* spp. and yeasts of the genus *Candida* spp., with *C. albicans* being the most prevalent species, and the levels of IL-1 β , IL-6, IL-17A and IL-33 increased, with the presence of *Candida* spp. with increased levels of IL-17A and IL-33. From the microbial profile of individuals with Periodontitis and OSA, nine bacteria and *C. albicans* were selected, isolated and cultured to establish an *in vitro* polymicrobial biofilm model, with which the anti-biofilm effect of nanofibers loaded with Amphotericin B(AMB), a palindromic antimicrobial peptide; Lactoferricin B (LfcinB (21-25)_{pal}) and/or Zinc Oxide (ZnO) were evaluated. In the same way, the cytotoxic effect and the physicochemical characteristics of the nanofibers were evaluated. It was determined that the nanofibers were biocompatible showing a cell viability greater than 50% of human periodontal ligament fibroblasts. The nanofiber with AMB, LfcinB (21-25)_{pal} and ZnO (Nf 6) showed greater inhibition, time-dependent, of the polymicrobial biofilm *in vitro*, demonstrating the ability of AMB to inhibit bacteria, together with LfcinB (21-25)_{pal} and ZnO increasing the anti-biofilm activity. The Nf 6 nanofiber exhibited good mechanical and thermal stability, was easy to handle, had a homogeneous fiber diameter distribution, and was hydrophilic. Finally, a technological survey of the use of these nanofibers was carried out. This technology prospection study demonstrated that this nanofiber may be a promising therapeutic alternative for the treatment of OSA-associated periodontitis, therefore, this nanofiber is proposed as a possibly patentable technology.

Keywords: Periodontitis, Obstructive Sleep Apnea, polymicrobial biofilms, amphotericin B, Lactoferricin B, ZnO, nanofibers.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pirámide ecológica de los complejos bacterianos de la biopelícula dental.....	27
Figura 2. Microbioma subgingival en salud y en periodontitis.....	29
Figura 3. Estructura de la Anfotericina B (Formula: $C_{47}H_{73}NO_{17}$).....	46
Figura 4. Estructura de la Lactoferricina B (LfcinB).	49
Figura 5. Desarrollo metodológico Artículo 1 y 2.....	63
Figura 6. Desarrollo metodológico Artículo 3.	97
Figura 7. Desarrollo metodológico Artículo 4	112
Figura 9. Mapa de palabras clave encontradas en la base de datos <i>Lens.org</i>	140
Figura 10. Flujos de interacción a partir de la palabra clave “periodontitis”- <i>Lens.org</i>	141
Figura 11. Mapa de palabras clave encontradas en la base de datos <i>Scopus</i>	142
Figura 12. Flujos de interacción a partir de la palabra clave “periodontitis”- <i>Scopus</i>	143
Figura 13. Mapa de palabras clave reportadas en los últimos 6 años.	145
Figura 14. Publicación de artículos a lo largo del tiempo.	146
Figura 15. Países más activos según el no. de publicaciones.....	146
Figura 16. Instituciones relacionadas con el número de publicaciones.	147
Figura 17. Depósito de patentes en los últimos 20 años.	152
Figura 18. Principales solicitantes según el estado legal de las patentes.....	153
Figura 19. Patentes activas protegidas en las distintas Oficinas nacionales	154
Figura 20. Distribución de los principales códigos IPC contenidos en las patentes.....	155

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos identificados en la microbiota oral de adultos con AOS.....	35
Tabla 2. Artículos que evalúan nanofibras para terapia periodontal	148
Tabla 3. Parámetros de búsqueda de patentes.....	151

INDICE DE ABREVIATURAS

A.a	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AMX	<i>Amoxicilina</i>
AMP	<i>Antimicrobial peptides</i>
AHI	<i>Apnea-hipopnea index</i>
APAP	<i>Autotitrating positive airway pressure</i>
BPAP	<i>Bi-level positive airway pressure</i>
BOP	<i>Bleeding on probing</i>
C. a	<i>Candida albicans</i>
DC	<i>Células dendríticas</i>
T $\gamma\delta$	<i>Células T gamma/delta</i>
Treg	<i>Células T reguladoras</i>
CXC	<i>Chemokine</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif)</i>
CIP	<i>Ciprofloxacina</i>
CAL	<i>Clinical Attachment Loss</i>
CHX	<i>Clorhexidina</i>
OTC	<i>Clorhidrato de oxitetraciclina</i>
CMI	<i>Concentración Mínima Inhibitoria</i>
CMIB	<i>Concentración mínima inhibitoria para la reducción de la densidad óptica de la biopelícula</i>
CPAP	<i>Continuous positive airway pressure</i>
DOX	<i>Doxiciclina</i>
DDS	<i>Drug delivery systems</i>
E.c	<i>E. coli</i>
E.co	<i>E. corrodens</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
EPS	<i>Extracellular polymeric substance</i>
F.n	<i>F. nucleatum</i>
TNF-α	<i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>
FCG	<i>Fluido Crevicular Gingival</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GCF	<i>Gingival Crevicular Fluid</i>
GI	<i>Gingival index</i>
HA	<i>Hidroxiapatita</i>
h	<i>hora</i>
IAH	<i>Índice de apnea-hipopnea</i>
IL	<i>Interleucinas</i>

IPC	<i>International Patent Classification</i>
MDS	<i>Multidimensional Scaling Analysis</i>
Mϕ	<i>Macrófagos</i>
MMP	<i>Metaloproteinasas</i>
MET	<i>Metronidazol</i>
mL	<i>Millilitro</i>
mm	<i>Milimetro</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NE	<i>Neutrophil elastase</i>
NSPT	<i>Non-surgical periodontal treatment</i>
OBL	<i>Osteoblastos</i>
OPG	<i>Osteoprotegerina</i>
ZnO	<i>Óxido de Zinc</i>
P.a	<i>P. aeruginosa</i>
P.i	<i>P. intermedia</i>
PAM	<i>Péptidos antimicrobianos</i>
PPD	<i>Periodontal Pocket Depth</i>
p/v	<i>peso/volumen</i>
PI	<i>Plaque index</i>
PCL	<i>Poly (e-caprolactone) (PCL)</i>
PLGA	<i>Poly (lactide-co-glycolide)</i>
PMMA	<i>Poly- methylmethacrylate</i>
PEO	<i>Poly(ethylene) oxide</i>
PDS	<i>polydioxanone</i>
PDLLA	<i>Poly-DL-lactic acid</i>
PLA	<i>Polylactic acid</i>
PVA	<i>Polyvinyl</i>
P. g	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PAP	<i>Positive airway pressure</i>
PCR	<i>Proteína C Reactiva</i>
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
S.a	<i>S. aureus</i>
S.sa	<i>S. sanguinis</i>
MTT	<i>Sal de tetrazolium</i>
SRP	<i>Scaling and root planing</i>
S.s	<i>Streptococcus salivarius</i>
Th	<i>T-helper cells</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>

SUMARIO

1. Introducción	26
1.1. Periodontitis.....	26
1.1.1 Microbiota oral asociada a periodontitis	26
1.1.2 Respuesta inflamatoria en la periodontitis	30
1.1.3 Tratamiento para la periodontitis.....	33
1.2 Apnea Obstructiva del sueño (AOS)	34
1.2.1 Microbiota oral asociada a AOS.....	35
1.2.2 Respuesta inflamatoria en AOS.....	36
1.2.3 Tratamientos para la AOS	37
1.3 Relación entre periodontitis y AOS	38
1.4 Biopelículas polimicrobianas.....	39
1.4.1 Estrategias para la inhibición de biopelículas polimicrobianas	41
1.4.2 Sustancias antimicrobianas	45
1.5 Planteamiento del problema	53
2. Pregunta de investigación.....	57
3. Objetivos.....	57
3.1 Objetivo general	57
3.2 Objetivos específicos.....	57
4. Desarrollo	59
4.1 Capítulo 1.....	59
4.1.1 Descripción artículos 1 y 2:.....	59
4.2 Capítulo 2.....	95
4.2.1 Descripción artículo 3:	95
4.1 Capítulo 3.....	110
4.1.1 Descripción artículo 4.....	110
4.2 Capítulo 4.....	138
4.2.1 Mapeo tecnológico	138
4.2.2 Prospección tecnológica.....	151
5. Discusión general	158
6. Conclusiones	170
7. Perspectivas	173
REFERENCIAS	175
ANEXOS.....	190

Artículo 2.....	190
Artículo 3.....	197
Distinciones y participaciones en eventos científicos.....	199



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad infecciosa e inflamatoria crónica multifactorial que afecta al 73% de la población colombiana ¹, al 91.7% de la población en Brasil ² y aproximadamente el 50% de la población adulta en el mundo ³. Se registraron aproximadamente 1.100 millones de casos prevalentes de periodontitis severa en todo el mundo en el 2019 con una tasa de prevalencia estandarizada por edad de 13.109 por 100.000 personas. La tasa de prevalencia estandarizada por edad global aumentó en un 8.4% de 1990 a 2019 ⁴.

Esta enfermedad es causada por la presencia de comunidades microbianas patógenas, denominadas microbiota disbiótica, organizadas en biopelículas estratificadas ^{5,6} que provocan una respuesta inflamatoria crónica del tejido periodontal, que resulta en la formación de bolsas periodontales, pérdida progresiva de inserción periodontal con destrucción de los tejidos blandos y duros de soporte periodontal, y posterior pérdida de los dientes ⁷. Aunque ya están descritos los patógenos asociados a esta enfermedad, aún persiste una alta prevalencia de periodontitis en el mundo, debido a su difícil diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad y a la creciente resistencia de los microorganismos a los antibióticos utilizados para su tratamiento ⁸.

1.1.1 Microbiota oral asociada a periodontitis

Esta enfermedad infecciosa está vinculada estrechamente con la microbiota disbiótica, en su mayoría conformada por bacterias, como factor determinante en la reacción inflamatoria de los tejidos periodontales que, en la misma medida, desencadena eventos inflamatorios sistémicos ⁹. Esta enfermedad usualmente ha sido asociada a bacterias consideradas periodontopatógenas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tanarella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Capnocytophaga* spp. ^{5,6,10}.

Hoy en día se reconoce que la periodontitis es una infección de origen endógeno, donde especies bacterianas periodontopatógenas, se encuentran también en biopelículas subgingivales de individuos sanos, sin embargo, la patogenicidad de estas biopelículas está influenciada por diferentes factores como el microambiente, los factores de virulencia de los microorganismos presentes y su abundancia ^{11,12}. En dichas biopelículas se destaca la presencia de las bacterias

como los principales agentes patógenos, los cuales han sido clasificados en complejos de colores, asignados según el papel que cumplen dentro de las biopelículas orales ¹³. Es así que se determinaron seis complejos (Figura 1):

- Complejo amarillo: constituido por colonizadores pioneros, anaerobios facultativos, acidófilos y fermentadores lácticos.
- Complejo azul: Íntimamente asociado con el anterior mediante coagregación.
- Complejo púrpura: comprende bacterias asociadas a las anteriores, una vez consumido el oxígeno en la biopelícula.
- Complejo verde: compuesto de anaerobios característicos de biopelículas maduras.
- Complejo naranja: comprende las bacterias que ocupan las zonas más profundas de la placa, consideradas bacterias “puente” entre los primeros colonizadores y las bacterias características de placas patológicas maduras.
- Complejo rojo: compuesto por las bacterias periodontopatógenas, las cuales son invasivas en contacto con la mucosa oral y están relacionadas estrechamente con la respuesta inflamatoria.

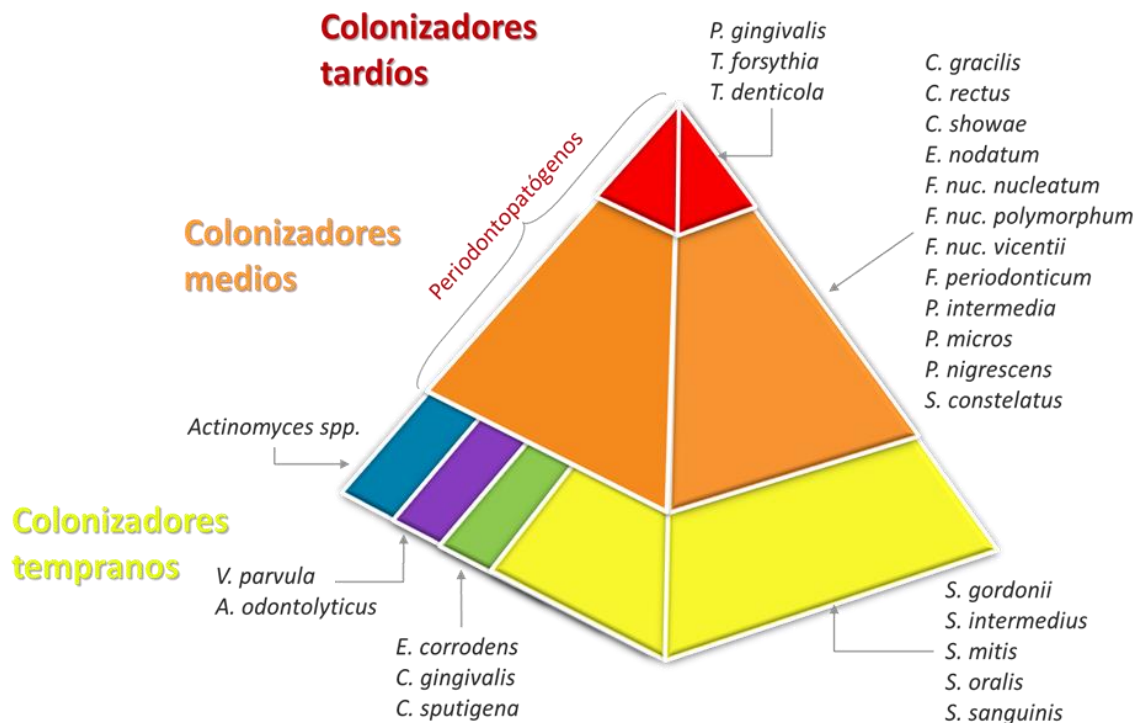


Figura 1. Pirámide ecológica de los complejos bacterianos de la biopelícula dental.
Adaptado de S. Socransky & Haffajee, 2002.

Adicionalmente, dado que la microbiota de la periodontitis varía entre las poblaciones dependiendo de diferentes factores como el área geográfica, raza, dieta, la genética y condiciones de vida, en Colombia se ha demostrado un perfil microbiano diferente al de otras poblaciones, similar al encontrado en Chile y Brasil, con una alta prevalencia de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* / *P. nigrescens*, *C. rectus*, *Fusobacterium spp.* y *E. corrodens* en individuos con periodontitis ¹⁴.

Un estudio reciente determinó las diferencias significativas entre la microbiota cultivable de muestras subgingivales de españoles (n=99) y de colombianos (n= 77). Las especies *Eikenella corrodens* y *Parvimonas micra* se detectaron con mayor frecuencia en sujetos con salud/gingivitis y *Porphyromonas gingivalis* en periodontitis. La microbiota de los sujetos colombianos se caracterizó por tener niveles más altos de *Tannerella forsythia*, *P. micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces odontolyticus* y *Capnocytophaga spp.*, siendo *P. micra* la más prevalente en salud/gingivitis y periodontitis estadio I-II, mientras tanto, la microbiota de los sujetos españoles se caracterizó por los altos niveles de *Campylobacter rectus* y *P. gingivalis*, siendo esta última la más prevalente en todos los grupos de periodontitis ¹⁵

Según resultados obtenidos en diferentes estudios en distintas cohortes de pacientes, se determinó que existen especies bacterianas fuertemente asociadas a salud y a la periodontitis. Los principales géneros y especie asociados con la salud fueron *Actinomyces spp.*, *Rothia spp.* y *S. sanguinis*, que en la periodontitis se agotan y establece un grupo de microorganismos con mayor diversidad, enriquecido por bacterias de especies gramnegativas. Se plantea que el microbioma de individuos sanos se podría agrupar en dos tipos de comunidades: tipo L, que está enriquecida con especies relacionadas con la salud, y tipo S, enriquecida con especies centrales y asociadas a la gingivitis. Por otro lado, dos tipos de comunidades también se asocian con la periodontitis, comunidades de tipo A enriquecidas con especies centrales y asociadas a la gingivitis, y comunidades de tipo B enriquecidas con especies fuertemente asociados con la periodontitis. Individuos con mayor severidad de la periodontitis se relacionan con comunidades de tipo B, indicando un estado disbiótico más avanzado y una modulación en la presencia de cada comunidad (Figura 2) ¹⁶.

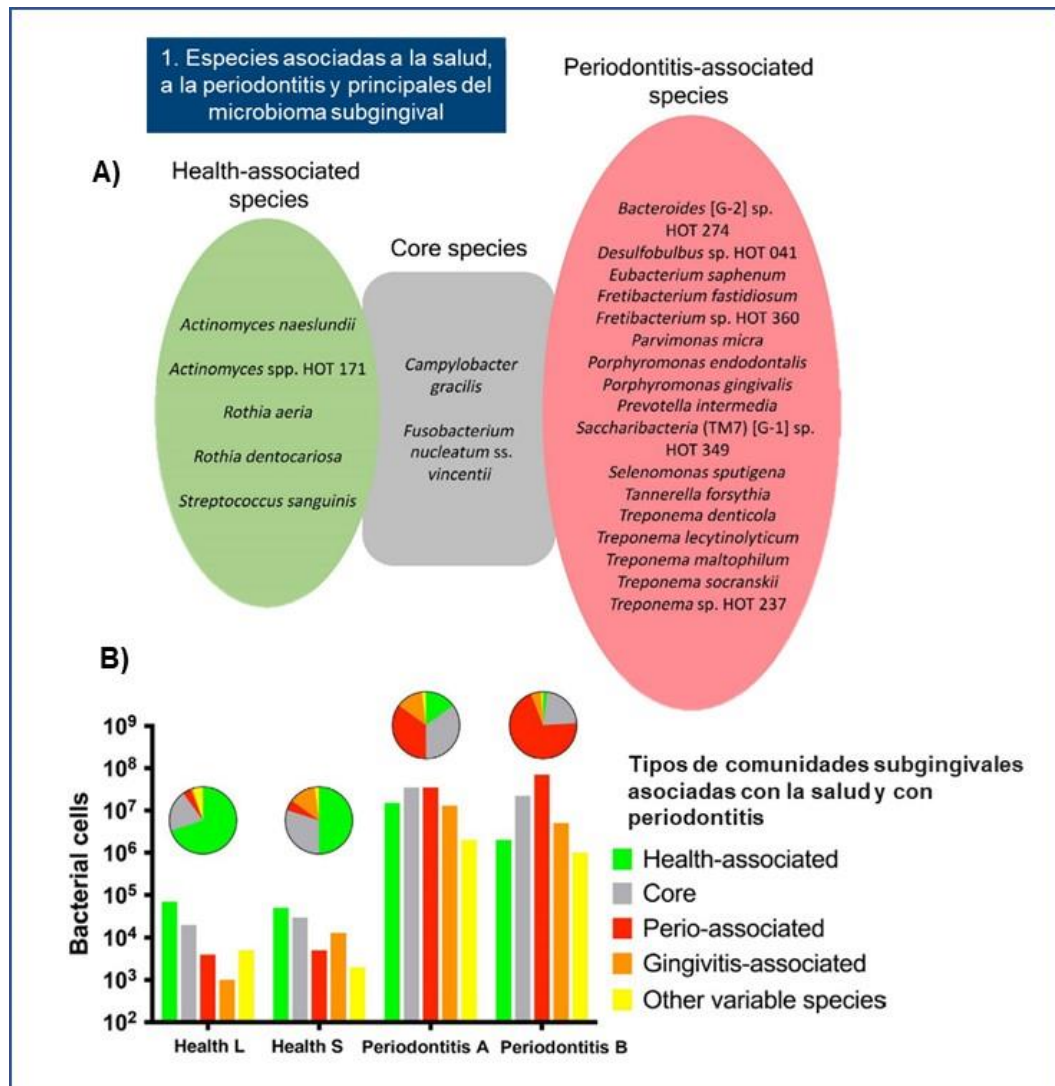


Figura 2. Microbioma subgingival en salud y en periodontitis.

A) Especies asociadas a la salud, asociadas a la periodontitis y centrales del microbioma subgingival. B) Tipos de comunidades subgingivales asociadas a la salud y asociadas a la periodontitis. Gráficas circulares: proporciones de cada grupo de especies en los diferentes tipos de comunidades. Gráficas en barras: abundancia total de cada grupo de especies en los diferentes tipos de comunidades. Tomado de *Curtis et al., 2020*.

No obstante, emergen nuevos estudios, que involucran otros agentes microbianos que no se asocian con la periodontitis, como *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*¹⁷ y levaduras del género *Candida* spp.^{18–21}. Estas levaduras son consideradas oportunistas debido a que tienen la capacidad de infectar tejidos orales, cuando hay cambios en el equilibrio de la microbiota oral. Se ha determinado la capacidad de *Candida*

spp. para formar biopelículas con bacterias orales, desempeñando un papel patogénico ^{22,23}, en enfermedades orales como la caries y la periodontitis ¹⁰. Es así que los cambios ambientales de la cavidad oral permite asociaciones de microorganismos bacterianos y levaduriformes ^{21,24}, los cuales tienen la capacidad de formar biopelículas polimicrobianas en el surco gingival, donde la presencia de *Candida* spp., podría cumplir un papel importante en la progresión de la periodontitis, por su capacidad de colonizar tejido gingival en mayor proporción ²⁵⁻²⁷, mediante la interacción con proteínas séricas, componentes presentes en la matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno, Nidógeno-1) y receptores celulares como cadherinas o integrinas, también tiene la capacidad de inactivar la vía alterna del complemento evitando su destrucción, además, su carácter dimórfico favorece la formación de hifas que le permiten adherirse y penetrar el tejido de la mucosa oral y también secreta enzimas degradativas como proteinasas y fosfolipasas que contribuyen al daño tisular e invasión del epitelio oral ²⁸⁻³⁰.

Además, la presencia de especies como *C. albicans* y su capacidad de formar biopelículas, permite la proliferación de bacterias patógenas anaerobios en entornos ricos en oxígeno, que de otro modo serían ambientes hostiles, y a su vez estas bacterias parecen inducir la formación de las biopelículas como estructuras protectoras ³¹. Diferentes autores han evaluado *in vitro* la interacción entre *C. albicans* y distintas bacterias. *P. gingivalis* es capaz de adherirse a las hifas de *C. albicans*, mediante la unión de proteínas específicas de adhesión como InIJ (P.g) y ALS3 (C.a) ³². *C. albicans* promueve el crecimiento de bacterias anaerobias estrictas, proporcionando microambientes anaerobios al consumir el oxígeno presente ³³. También, *C. albicans* promueve la formación de biopelículas de bacterias orales como *S. gordonii*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, considerados los primeros colonizadores en las biopelículas orales ³⁴.

Esto hace plantearnos la importancia de entender cómo las levaduras también pueden estar contribuyendo al desarrollo de biopelículas disbióticas polimicrobianas y cuál es el papel que cumplen dentro de estas estructuras, de tal forma que se plantea la opción de incorporar a *Candida* spp. como un género de microorganismos de importancia en el contexto de la enfermedad periodontal, el cual puede servir un como un “comensal clave”, que proporciona consorcios de estructuras sólidas y de difícil eliminación como son las biopelículas ³⁵.

1.1.2 Respuesta inflamatoria en la periodontitis

La respuesta a la presencia de una microbiota disbiótica, se inicia por la unión de antígenos microbianos a receptores tipo Toll (TLRs) en las células inmunitarias. Estos receptores activan

las vías de transducción de señales, que activan respuestas inmunitarias e inflamatorias para eliminar los microorganismos patógenos ³⁶. Después del reconocimiento de los microorganismos, se secretan quimiocinas para atraer fagocitos. El sistema del complemento también genera proteínas biológicamente activas, incluidas las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a que atraen a las diferentes células inmunitarias del hospedero, monocitos, linfocitos y neutrófilos, respectivamente ^{37,38}.

Los monocitos migran al sitio de la inflamación, se diferencian en macrófagos y cumplen múltiples funciones: contribuyen a la fagocitosis para eliminar los microorganismos, eliminan los desechos celulares y los neutrófilos apoptóticos resultantes de la fagocitosis, actúan como un puente entre la inmunidad innata y adquirida por reclutamiento de linfocitos, y liberan citocinas y presentan antígenos ³⁹. Los neutrófilos son los primeros leucocitos en responder, se acumulan en los sitios inflamados para cumplir funciones fagocíticas y antimicrobianas. Los neutrófilos reclutados en el surco gingival invaden el tejido conectivo e interactúan con otras células inmunitarias, como macrófagos (M ϕ), células dendríticas (DC) y células T $\gamma\delta$. Estas células producen mediadores proinflamatorios, citocinas de reabsorción ósea como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), la interleucina (IL)-1 β y la IL-17, que, a su vez regulan el desarrollo de las células T-helper (Th), que también contribuyen y exacerbaban la respuesta inflamatoria ⁴⁰. Estas citocinas inducen la destrucción tisular y la reabsorción ósea mediante la activación de colagenasas y también a través del receptor activador del ligando del factor nuclear kappa-B (RANKL) que estimula la diferenciación de los osteoclastos ^{41,42}. El RANKL y el sistema de osteoprotegerina (OPG: receptor señuelo soluble que inhibe la interacción de RANKL con su receptor funcional) regula la osteoclastogénesis. El aumento de RANKL y la disminución de OPG son una característica de la periodontitis ⁴².

El TNF- α es una citocina proinflamatoria, que juega un papel clave en la respuesta inmune antimicrobiana. Es producido principalmente por macrófagos como una respuesta primaria de la señalización por TLRs, por las células T activadas y las células asesinas naturales (NK-Natural Killer). Junto a la IL-1 β producen un efecto sinérgico al aumentar la síntesis de IL-6, lo que resulta en una mayor activación de las células Th17 ⁴¹.

La IL-1 β es una citocina proinflamatoria, ampliamente estudiada como biomarcador salivar en enfermedad periodontal. En la periodontitis se asocia con activación y reclutamiento de neutrófilos y células T y B. Además de activación de osteoclastos a través de su capacidad de inducir quimiocinas ⁴³. También se conoce que aumenta la expresión de enzimas colagenolíticas,

metaloproteinasas de matriz (MMP), que contribuyen a la degradación de la matriz extracelular y, a su vez, conducen a la reabsorción ósea y la destrucción tisular. IL-1 β estimula la expresión de MMP-1, MMP-3 y MMP-9 en células del ligamento periodontal humano y células de fibroblastos gingivales. Regula positivamente RANKL y, por lo tanto, estimula la osteoclastogénesis ⁴⁴. La asociación entre la periodontitis y la interleucina-1 β elevada en el líquido crevicular gingival está bien establecida. Se ha demostrado un nivel significativamente más alto de IL-1 β en pacientes con periodontitis en comparación con controles sanos, los cuales disminuyen luego del tratamiento periodontal ^{45,46}.

La IL-6 es una citocina multifuncional que tiene un impacto sustancial en el daño del tejido periodontal. Es producida por células de la inmunidad innata como células dendríticas, macrófagos y T CD4+. Así mismo, puede ser producida por fibroblastos y células endoteliales. TNF- α e IL-1 β pueden aumentar sinérgicamente la producción de IL-6, que a su vez contribuirá a una mayor diferenciación de células Th17 en procesos homeostáticos ⁴⁷, pero junto a la IL-23 desencadena una mayor acumulación de las células Th17 ⁴⁸; células productoras de IL-17 y RANKL ⁷. Por otro lado, la IL-6 aumenta el número de osteoclastos, induce a la producción de superóxido, el remodelado vascular y la disfunción endotelial inducida por la angiotensina II ⁴³. Promueve cascadas de procesos destructivos del tejido periodontal en fases iniciales de la periodontitis y se encuentra en niveles elevados en el fluido crevicular gingival. Además, la IL-6 mejora indirectamente la formación de osteoclastos al elevar la producción de activadores del receptor de RANKL de los osteoblastos ⁴¹.

La IL-17 es una citocina producida por las células T-helper 17 (Th17) después de la activación de la inmunidad adaptativa y sirve para reforzar las respuestas inmunitarias proinflamatorias ⁴⁹. La IL-17A actúa sobre tipos de células del tejido conjuntivo e inmunitario innato, como neutrófilos, fibroblastos y osteoblastos. A través de estas interacciones, la IL-17 induce la producción de quimiocinas (CXC), MMP y moléculas destructoras de tejidos, como especies reactivas de oxígeno (ROS), RANKL por parte de los osteoblastos (OBL), que impulsa la maduración de los precursores de osteoclastos (OCP), que posteriormente estimula la diferenciación osteoclástica y la pérdida ósea alveolar ⁴⁰. Aunque su concentración en saliva es mínima tanto en salud como en enfermedad periodontal, dos estudios que compararon los niveles de IL-17 encontraron concentraciones significativamente menores en salud. ⁵⁰.

Por otro lado, se ha determinado la participación de otras citocinas en la periodontitis, como la IL-33 perteneciente a la familia de citocinas IL-1, expresada abundantemente en células

endoteliales, epiteliales y fibroblastos, en homeostasis como en inflamación. Es una citocina de doble función que puede desempeñar papeles importantes como citocina (proinflamatoria) y como factor nuclear intracelular (antiinflamatoria). También, funciona como una señal de alarma (alarmina), como una señal de peligro endógena para alertar a las células del sistema inmunitario innato sobre el daño tisular durante un traumatismo o una infección, ya que puede liberarse en el espacio extracelular después del daño de las células endoteliales o una lesión mecánica ^{51,52}. Está involucrada en la diferenciación de monocitos en osteoclastos, estimula la producción de RANKL y disminuye la producción de OPG y la posterior activación de osteoclastos ⁵³. Se encuentra sobre expresada en células epiteliales gingivales en pacientes con periodontitis ⁵⁴, con altas concentraciones en fluido crevicular gingival (FCG) y plasma ⁵⁵.

1.1.3 Tratamiento para la periodontitis

El tratamiento o terapia periodontal comprende un amplio rango de intervenciones que tienen el objetivo de controlar la infección, detener los procesos inflamatorios, minimizar los síntomas y reducir el riesgo de pérdida de los dientes. El primer paso en el tratamiento profesional incluye disminuir la infección mediante la eliminación de la biopelícula subgingival mediante remoción mecánica, controlando los factores de riesgo predisponentes de la periodontitis y mejorando los parámetros periodontales, reduciendo la profundidad de la bolsa al sondaje (PPD) aumentando el nivel de inserción clínica (CAL). En la inhibición de la biopelícula subgingival se pueden incluir agentes químicos coadyuvantes o medicamentos antimicrobianos o antiinflamatorios locales/sistémicos ^{56,57}.

El raspado y alisado radicular (SRP, por sus siglas en inglés) representa el método convencional en el tratamiento periodontal no quirúrgico (NSPT, por sus siglas en inglés) que por sí solos pueden no ser suficiente para restablecer la salud periodontal en casos de pacientes con periodontitis avanzada ⁵⁶. Por lo tanto, se hace necesario el uso complementario de agentes antisépticos como la clorhexidina (CHX), la cual ha demostrado eficacia clínica al mejorar los parámetros periodontales PDD y CAL, sin embargo, la CHX induce una disminución del pH salival que implica un mayor riesgo de desmineralización dental, inflamación de las glándulas parótidas, pigmentación de los tejidos blandos orales y dientes, reacciones de hipersensibilidad tipo 1, alteración del gusto y sensación de ardor ⁵⁸. Entre otras terapias complementarias a la SRP, la amoxicilina y el metronidazol han demostrado una fuerte evidencia científica para su uso en la práctica clínica diaria ⁵⁹, sin embargo, pacientes pueden presentar mala respuesta a la NSPT

estándar, ya que la terapia no tiene la capacidad de revertir el proceso infeccioso disbiótico a un equilibrio homeostático o comensal, probablemente debido a la biopelícula subgingival residual en la bolsa periodontal después de la terapia y/o a la invasión tisular por microorganismos periodontopatógenos, o por la persistencia de una respuesta inflamatoria crónica no resolutive a pesar del desbridamiento subgingival. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que el uso de antibióticos debería ser restringida a pacientes periodontales específicos, con tiempos de uso determinados y reducidos, considerando los efectos secundarios sistémicos junto a los efectos microbiológicos adversos, como el desarrollo y aumento de la resistencia a los antibióticos ⁵⁸. Vinculado a esto está que el uso de antibióticos no está dirigido a contrarrestar la infección por consorcios polimicrobianos bacterianos asociados a levaduras, disminuyendo la probabilidad de éxito del tratamiento con antibióticos ⁶⁰. Todo esto puede dificultar un adecuado tratamiento, permitiendo la progresión de la periodontitis.

1.2 Apnea Obstructiva del sueño (AOS)

La AOS es un trastorno respiratorio del sueño, causada por la interacción de factores genéticos con factores obstructivos anatómicos, neuromusculares o inflamatorios que obstruyen la vía aérea impidiendo el paso de aire ⁶¹. Este trastorno se produce cuando colapsan los tejidos blandos alrededor de la vía aérea superior, obstruyendo parcial (hipopnea) o completamente (apnea) el flujo de aire a pesar del incremento en el esfuerzo ventilatorio ⁶². La presencia y severidad de AOS se determina mediante un estudio polisomnográfico ⁶³ que determina el Índice de Apnea-Hipopnea (IAH: media de eventos de apneas o hipopneas por hora (h) de sueño). La gravedad de la AOS se define en función de los siguientes umbrales: IAH < 5: sin AOS; 5 < IAH < 15: AOS leve; 15 < IAH < 30: AOS moderada; y IAH ≥ 30: AOS severa ⁶⁴.

La AOS es el trastorno respiratorio de sueño más común, 1000 millones de personas lo padecen ⁶⁵. En los Estados Unidos y Europa entre el 14% y el 49% de los hombres de mediana edad presentan AOS ⁶⁶. En Colombia, la prevalencia es del 49,6% en personas entre 30 y 65 años; en dos estudios realizados en el 2016 y 2017 en las ciudades de Bogotá, Bucaramanga y Santa Marta se encontró una prevalencia de trastornos del sueño del 19% en adultos con una frecuencia de 14% de somnolencia diurna excesiva ^{67,68}.

La AOS es un trastorno frecuente y representa un serio problema de salud pública en varios países del mundo, debido a que es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares ⁶⁹,

Diabetes mellitus ⁷⁰, Periodontitis ⁷¹, Cáncer de pulmón y de seno ⁷², Enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer ^{73,74} y Parkinson ⁷⁵. Esto riesgo podría verse relacionado por la fisiopatogenia del trastorno, la cual incluye hipoxia intermitente, hipercapnia, estrés oxidativo, fragmentación del sueño, sequedad oral e inflamación sistémica ^{62,76–78}.

1.2.1 Microbiota oral asociada a AOS

Los reportes acerca de la microbiota oral en individuos con AOS es limitada. Hasta el momento se han reportado ocho estudios, de los cuales tres reportan resultados de población pediátrica ⁷⁹. A pesar que hay diferencias en las metodologías aplicadas para determinar los microorganismos presentes en el microbiota oral, todos los reportes sugieren que la AOS y sus condiciones como la respiración por la boca y la sequedad oral, serían características que podrían contribuir a las diferencias en la ecología microbiana, influyendo en la aparición y/o progresión de enfermedades orales, como la caries y la periodontitis. La sequedad oral dada por la respiración por la boca, también puede impedir la capacidad de autolimpieza de la mucosa oral y provocar un aumento de la colonización bacteriana ⁸⁰.

La composición de la comunidad bacteriana difiere significativamente entre individuos que tienen AOS y aquellos que no, con la presencia de patógenos periodontales específicos. Los individuos con AOS pueden albergar cantidades más altas de patógenos periodontales, particularmente en AOS severa, en comparación con los individuos sin AOS o con AOS leve/moderada (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos identificados en la microbiota oral de adultos con AOS

Muestra oral	Número de individuos con AOS	Metodología de identificación	Géneros de Microorganismos	Referencia
Saliva	39	RT-qPCR	<i>Streptococcus</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Tanarella</i>	<i>N. Nizam et al., 2016</i>
Mucosa oral	126	Secuenciación del gen 16S rRNA	<i>Porphyromonas</i> <i>Aggregatibacter</i>	<i>Ko et al., 2019</i>
Saliva	15	Secuenciación del gen 16S rRNA	<i>Scardovia</i>	<i>Jia et al., 2020</i>
Saliva	27	Secuenciación del gen 16S rRNA	<i>Prevotella</i>	<i>Y. Chen et al., 2021</i>

Saliva	27	Secuenciación del gen 16S rRNA	<i>Neisseria</i> <i>Rothia</i> <i>Actinomyces</i> <i>Gemella</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Granulicatella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Treponema</i>	X. Chen et al., 2022
---------------	----	--------------------------------	--	-------------------------

1.2.2 Respuesta inflamatoria en AOS

La privación del sueño afecta los componentes y la respuesta del sistema inmunitario, generando procesos inflamatorios sistémicos con incremento de marcadores inflamatorios, los cuales juegan un papel crítico en la fisiopatología de la AOS ^{85,86}. Diferentes estudios han logrado determinar la presencia y el aumento de diferentes marcadores inflamatorios en suero, definiendo un perfil inflamatorio en los individuos que padecen este trastorno.

Este perfil inflamatorio se ha caracterizado por la activación del factor transcripcional NF-kappaB en monocitos de sangre periférica y activación de la vía RANKL ⁸⁷. Adicionalmente, se ha determinado un aumento de IL-6 e IL-1 β debido a la hipoxia, la IL-33 “Alarmina” se libera por el daño celular y está asociada a la severidad de AOS, y junto a la IL-1 β se relaciona con inflamación aguda y crónica ^{85,86,88}. La IL-33 estimula la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en macrófagos e IL-5 y IL-8, junto a la producción de ROS en eosinófilos ⁸⁹. De igual forma, se reporta un incremento de la IL-23, que es secretada por macrófagos y células dendríticas y es una citocina esencial en el mantenimiento de las células Th17, la secreción de IL-17A y la proliferación de células T de memoria ⁹⁰. La severidad de AOS está asociada al incremento de TNF- α y PCR (Proteína C Reactiva) (Yi et al., 2022). Incluso se reportó una expresión significativamente mayor de IL-1 α , IL-6 y TGF- β en la mucosa y de quimiocina CCL5 (RANTES) en músculo de las vías aéreas superiores de individuos con AOS severa; TGF- β se detectó en células inflamatorias submucosas y peri musculares, mientras que la IL-6 se localizó principalmente en los miocitos (Kimoff et al., 2011).

Se ha sugerido que en los individuos con AOS, el aumento de IL-6 y la reducción de TGF- β promueven potencialmente el desequilibrio Th17/Treg. El cambio del equilibrio IL-17/TGF β hacia IL-17 podría favorecer la acumulación de mediadores inflamatorios y, finalmente, amplificar el

entorno proinflamatorio en AOS moderada/severa (Reale et al., 2020). Sin embargo, se ha determinado un aumento significativo de los niveles séricos de IL-35 e IL-37, asociado con la severidad de la AOS. La IL-35 y la IL-37 son citocinas antiinflamatorias, secretadas por linfocitos, monocitos y células epiteliales, entre otros; IL-35 puede limitar la proliferación temprana de células T, bloqueando el desarrollo de células Th1 y Th17 y la IL-37 regula a la baja la producción de citocinas proinflamatorias. Esto implica que ambas citocinas podrían desempeñar un papel protector en la AOS al contrarrestar las respuestas inflamatorias (B. Chen et al., 2021).

Por otro lado, la AOS puede estar asociada con la disminución de la capacidad de los neutrófilos para fagocitar microorganismos y producir especies reactivas de oxígeno (ROS), esto relacionado con la privación del sueño (Said et al., 2017) y además, también se ha reportado la disminución de los niveles de MMP y NE (Elastasa de neutrófilos), enzimas liberadas por neutrófilos en saliva y suero de individuos con AOS (Nizam et al., 2015). Sin embargo, la AOS puede estar asociada con un mayor potencial proliferativo de las células T NK y CD4 (Said et al., 2017).

1.2.3 Tratamientos para la AOS

Existen diferentes tratamientos para la AOS y su aplicación depende de la severidad del trastorno y características clínicas del paciente. Estos tratamientos incluyen farmacoterapia, tratamientos no quirúrgicos como la presión positiva continua en las vías respiratorias (PAP), dispositivos orales y procedimientos quirúrgicos. La farmacoterapia que incluye el uso de esteroides y antagonistas de los receptores de leucotrienos, es indicada con mayor frecuencia en niños. Sin embargo, aún no se ha establecido con claridad la eficacia de estos tratamientos. Las terapias tipo PAP están indicadas en ASO moderada y severa, y tienen como función bombear aire bajo presión dentro de las vías respiratorias. Incluye tres modos básicos: presión positiva continua en las vías respiratorias (CPAP), presión positiva en las vías respiratorias de dos niveles (BPAP) y presión positiva en las vías respiratorias con autotitulación (APAP). A pesar de ser considerados el tratamiento más efectivo para AOS, el cumplimiento deficiente o la intolerancia de uso limita la eficacia del mismo (Chang et al., 2020; Tingting et al., 2018).

También existen dispositivos orales (dispositivos de retención de la lengua y de avance mandibular) que tienen la capacidad de ampliar las vías respiratorias superiores al modificar la posición de la lengua y las estructuras anatómicas asociadas. Estos dispositivos son bien

tolerados en la mayoría de los pacientes, con mayor cumplimiento en su uso y con resultados clínicos satisfactorios similares a las terapias tipo PAP. Se considera la elección predilecta para el tratamiento de la AOS leve y moderada, y en casos severos, cuando la terapia con PAP es ineficaz (Tingting et al., 2018), sin embargo, la efectividad depende de la duración de su uso (Mecenas et al., 2021).

1.3 Relación entre periodontitis y AOS

La relación causa-efecto entre la periodontitis y la AOS aún es objeto de controversia, no obstante, se ha sugerido diversos mecanismos que involucran factores genéticos, inmunológicos y microbiológicos, los cuales no han sido totalmente elucidados. Se plantean diferentes hipótesis sobre el aumento de la periodontitis en sujetos con AOS, a causa de una predisposición genética o por la respuesta inflamatoria compartida en ambas patologías. Igualmente, las características fisiopatológicas como la sequedad oral, aumentando el riesgo de infecciones bacterianas y fúngicas, disminuye la habilidad del sistema inmune para responder a las infecciones, se altera la remodelación ósea estimulada por la hipoxia y se aumentan los niveles de CO₂, lo que permitiría la colonización de una microbiota disbiótica en la cavidad oral.

La prevalencia de la periodontitis y la AOS se reporta en diferentes estudios alrededor del mundo. En un estudio piloto en Australia, se identificó una asociación entre Periodontitis y AOS, y señalaban que la AOS incrementa la presencia y severidad de la periodontitis al favorecer el aumento de la inflamación sistémica (Gunaratnam et al., 2009). En un estudio de casos y controles en Taiwán, los autores reportaron una diferencia significativa entre los casos representados por pacientes con AOS y los individuos controles sin AOS (Keller et al., 2013). Seo *et al.* en 2013 en Corea, realizaron un estudio longitudinal en el cual incluyeron 687 pacientes coreanos y reportaron que un 60% de los pacientes diagnosticados con AOS presentaron periodontitis (Seo et al., 2013). Sanders *et al.* demostraron que personas latinoamericanas con AOS tienen mayor riesgo de tener periodontitis severa que las personas sin AOS (Sanders et al., 2015). Además, Cuervo *et al.* en 2016 describieron la condición periodontal de los pacientes colombianos que asistieron a estudio polisomnográfico, determinando que de los 166 pacientes evaluados: 71% tenían AOS, de los cuales 58% tenían periodontitis y 37% tenían gingivitis (Cuervo et al., 2016). Gamsiz-Isik *et al.* en 2017 determinaron que existe una mayor prevalencia de periodontitis y niveles más altos IL-1 β en FCG y Proteína C reactiva (PCR) en suero en

pacientes turcos con AOS (Gamsiz-Isik et al., 2017). Un estudio transversal en Los Países Bajos, el 21% de 70 pacientes con periodontitis, tuvieron un "alto riesgo" de padecer AOS (Verhelst et al., 2022). Un estudio transversal determinó que los pacientes con AOS moderada-severa tenían estadios más graves de periodontitis (estadios III y IV) (Stazić et al., 2022).

Además, se han evaluado biomarcadores séricos y salivales y once bacterias de placa subgingival como candidatos putativos en la posible asociación entre AOS y la enfermedad periodontal, encontrando un aumento de la severidad de AOS con niveles incrementados de IL-6 (Nizam et al., 2016) y de IL-33 (Nizam et al., 2014) salivales, con cambios no significativos en la composición de las bacterias de la placa subgingival con la presencia en mayor proporción de *S. oralis* en AOS moderada y *F. nucleatum* y *T. forsythia* en AOS severa. Chen *et al.* determinaron que la comunidad microbiana salival de individuos con AOS estaba alterada, en cuanto a riqueza de especies y diversidad trans-hábitat, con un incremento de *Prevotella* spp., un patógeno periodontal específico, mostrando una tendencia creciente en individuos con AOS (Y. Chen et al., 2021).

Diferentes revisiones sistemáticas y meta-análisis han sugerido diferentes mecanismos probables para explicar la asociación entre la periodontitis y la AOS: 1) La hipoxia intermitente puede proporcionar las condiciones para el estrés oxidativo y la inflamación sistémica. 2) El secado de oral como resultado de la respiración abierta crónica puede impedir su autolimpieza de la mucosa oral por el flujo salival, lo que podría conducir a la progresión de la periodontitis. 3) Hay una disminución del pH que podría estar estimulando la colonización microbiana y, por ende, la formación y la acumulación de la placa dental o biopelícula. 4) La inflamación asociada con la AOS junto con las disminuciones intermitentes en la oxigenación pueden influir en la composición y la ecología de la microbiota oral, influyendo en el inicio y/o la progresión de la periodontitis. Y 5) Tanto la periodontitis como la AOS están vinculadas a la inflamación sistémica, lo que puede explicar parcialmente la asociación entre estas dos condiciones (Bianchi et al., 2022; Khodadadi et al., 2022).

1.4 Biopelículas polimicrobianas

La formación de las biopelículas polimicrobianas en la cavidad oral tiene cuatro etapas de desarrollo: a) Adhesión inicial: en la que los microorganismos se adhieren a una superficie (mucosa, dientes, dispositivos orales), a través de adhesinas asociadas a la superficie celular; b)

Formación temprana de biopelícula: los microorganismos comienzan a dividirse y producen la sustancia polimérica extracelular (EPS), que favorece la adhesión y permite la agregación de más microorganismos; c) Maduración de la biopelícula: se desarrollan estructuras tridimensionales, favorecidas por la presencia de EPS, la cual proporciona un andamio multifuncional y protector, generando microambientes químicos y físicos heterogéneos donde los microorganismos coexisten dentro de interacciones polimicrobianas y sociales (competitivas y sinérgicas); y d) Dispersión: los microorganismos abandonan la biopelícula para volver a entrar en la fase planctónica y colonizar nuevas superficies (Beitelshees et al., 2018; Koo et al., 2017; C. Martin et al., 2015).

Las biopelículas polimicrobianas no son de fácil remoción o inhibición dadas sus propiedades físicas, biológicas complejas, acompañadas de múltiples factores genéticos y moleculares microbianos, donde interactúan múltiples especies (bacterias grampositivas y gramnegativas, levaduras, anaerobios facultativos o estrictos). Koo *et al.*, destacó las siguientes propiedades de las biopelículas: 1) la capacidad de adherencia a una gran variedad de superficies inertes (plásticos, metales, cerámicas e híbridos) y superficies bióticas (esmalte dental, huesos, piel, mucosas, tejido conectivo y endotelio), utilizando interacciones específicas (adhesinas bacterianas-receptores del hospedero) y mecanismos de adhesión no específicos (fuerzas hidrofóbicas o electrostáticas). 2) Producción de una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS), la cual puede variar en su composición (polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos) según las especies microbianas presentes y las condiciones de crecimiento (tipo y abundancia de nutrientes, hidrodinámica, temperatura y concentración de oxígeno). Esta matriz extracelular EPS proporciona un andamiaje esencial para la estabilidad mecánica, adhesión a las superficies y crea microambientes químicos y físicos compartimentados que brindan protección a las células dentro de una estructura tridimensional (3D) heterogénea. 3) Poseen viscoelasticidad que permite que las biopelículas absorban y disipen energía, en lugar de desprenderse, cuando se exponen a fuerzas mecánicas, como el corte hidrodinámico. Por un lado, el componente elástico permite que la biopelícula vuelva a su forma durante perturbaciones intermitentes, mientras que el componente viscoso permite que las biopelículas fluyan de forma similar a los líquidos cuando se mantienen las fuerzas mecánicas. 4) Las biopelículas son heterogéneas, es decir, no uniformes en distribución, estructura 3D y fisiología en varias escalas espaciales. Dentro de la biopelícula, se desarrollan microambientes heterogéneos que modulan la actividad microbiana, la señalización intercelular y el intercambio metabólico, lo que conduce a la organización espacial

de los comportamientos celulares y comunitarios, factores importantes para la tolerancia y la persistencia (Koo et al., 2017).

1.4.1 Estrategias para la inhibición de biopelículas polimicrobianas

La compleja estructura de las biopelículas proporciona protección a los microorganismos que la conforman contra el sistema inmunitario del hospedero, a través de la activación defectuosa de los fagocitos y el sistema del complemento, restringe la penetración de agentes antimicrobianos y, por otro lado, aumenta su resistencia contra los antibióticos convencionales alrededor de 1000 veces. Se ha reportado que dicha resistencia es influenciada por la presencia limitada de oxígeno y además, los microorganismos en biopelículas experimentan una mayor tasa de mutación comparados con microorganismos planctónicos, lo que resulta en un aumento de 10 veces en la eficiencia de la transferencia de plásmidos que tiene un gen de resistencia a los antibióticos (Roy et al., 2018). Es así que se establecen algunos factores que afectarían la susceptibilidad de las biopelículas a agentes antimicrobianos: 1) baja y lenta penetración de los antimicrobianos a través de la intrincada red de canales de la biopelícula; 2) respuestas de estrés activadas como consecuencia de la competencia por el espacio y nutrientes, 3) heterogeneidad de la población de biopelículas; y 4) presencia de variantes fenotípicas como resultado de eventos de coevolución y evolución adaptativa en una subpoblación de microorganismos persistentes. La combinación de todos o algunos de estos factores favorecería la función sobreprotectora de las biopelículas (Soria et al., 2019).

Se plantean diversas estrategias u oportunidades para la intervención terapéutica de las infecciones causadas por estas estructuras complejas, teniendo en cuenta las etapas de formación de las biopelículas polimicrobianas: a) En la fase inicial, se puede interrumpir la formación de las biopelículas al evitar la unión y las interacciones entre los microorganismos, o entre los microorganismos y la superficie, también, al inhibir las adhesinas asociadas a la superficie celular (apéndices, proteínas y EPS); b) En las primeras etapas del desarrollo de biopelículas, se puede inhibir la producción de EPS y la división celular; c) Las biopelículas formadas se pueden inhibir mediante la eliminación física, la degradación de la matriz de EPS, establecimiento de microambientes dañinos (cambios de pH y/o concentraciones de oxígeno) y eliminación de microorganismos latentes; y d) Inducción de la dispersión de la biopelícula por la remodelación de la matriz de EPS o la activación del mecanismo de dispersión (Beitelshees et al., 2018; Koo et al., 2017).

Por lo tanto, teniendo en cuenta las propiedades de las biopelículas y su conformación polimicrobiana, se hace necesario encontrar estrategias para dispersar y/o eliminar estas estructuras, de tal forma que se pueda prevenir o tratar enfermedades como la periodontitis. Diferentes estudios se han enfocado en encontrar y evaluar sustancias antimicrobianas como estrategias que tengan la capacidad de controlar o inhibir biopelículas relacionadas con las enfermedades orales. Estas estrategias pueden tener más beneficios que aplicar el SRP solo, por lo tanto, se acompaña de la administración local de antimicrobianos, antibióticos, clorhexidina (CHX), aceites esenciales, el triclosán y el cloruro de cetilpiridino, entre otros.

La CHX, un antiséptico ampliamente utilizado principalmente en enjuagues orales, es considerado el estándar de oro por su eficacia en el control químico de la biopelícula supragingival en formación, en comparación de otros agentes anti-biopelícula (dos Santos et al., 2017). La administración local de CHX combinada con el raspado y alisado radicular (SRP) mejora el resultado del tratamiento periodontal (Del Rei et al., 2021). También se ha demostrado la efectividad de un Chip que contiene CHX (PerioChip®), compuesto por una matriz de gelatina hidrolizada biodegradable, reticulada con glutaraldehído, contiene glicerina, agua, y 2,5 mg de Gluconato de CHX, el cual se usa en combinación con SRP para el tratamiento de local de biopelículas subgingivales y mejoría en los parámetros periodontales, pero parece no ofrecer ningún beneficio adicional al SRP durante la fase de mantenimiento del tratamiento periodontal (Elnagdy et al., 2021). Además, el uso de clorhexidina se asocia con eventos adversos como tinción de dientes, restauraciones, aparatos protésicos e incluso la lengua, así como alteraciones del gusto, formación de cálculos supragingivales y, posiblemente, inflamación reversible de los labios o glándulas parótidas, descamación de la mucosa oral, urticaria, disnea y shock anafiláctico (dos Santos et al., 2017).

Existen otras terapias convencionales comercializadas como Periostat, un tratamiento de administración oral de Doxiciclina a bajas dosis, el cual no erradica totalmente la presencia de los microorganismos, pero si mejora la severidad de la inflamación en la periodontitis. El Triclosán es un potente antibacteriano de baja solubilidad, con poca retención en la cavidad oral, y por lo tanto no puede administrarse en forma de polvo o gel. Elyzol® es otro tipo de suspensión en gel compuesto de metronidazol. Atridox®, un gel antibacteriano compuesto de Doxiciclina de aplicación local. PerioPatch® es un parche tópico de hidrogel está compuesto por una matriz polimolecular absorbente a base de extractos de plantas naturales (*Sambucus nigra*, *Echinacea purpurea*, *Centella asiatica*). Dentomycin®, es un gel bioabsorbible en jeringa para la administración local, compuesto de Clorhidrato de minociclina, antibiótico del grupo de las

tetraciclinas (Fernandesa et al., 2018). La mayoría de estos tratamientos están también indicados a mejorar la inflamación presente en el tejido gingival, mejorando los parámetros periodontales, no obstante, no están dirigidos a la eliminación de microorganismos como las levaduras.

1.4.1.1 Sistemas de liberación controlada de fármacos (SLCF)

Algunos fármacos terapéuticos potencialmente útiles podrían tener una actividad limitada debido a sus pobres propiedades biofarmacéuticas. La toxicidad, solubilidad, biodistribución y estabilidad son factores que pueden afectar la administración, así como la actividad del fármaco *in vivo*. La estabilidad es importante ya que los agentes inestables pueden tener una farmacocinética desfavorable y degradarse antes de expresar su actividad (C. Martin et al., 2015). Es así que se han desarrollado herramientas para la administración *in situ* de agentes antimicrobianos, denominadas Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos (CDDS- por sus siglas en inglés). Estos sistemas tienen la capacidad de encapsular fármacos, mejorar su eficacia y sus propiedades biofarmacéuticas, además, pueden adaptarse a diversas vías de administración, protegen los fármacos de factores ambientales y proporcionan una liberación controlada y dirigida (C. Martin et al., 2015). Los SLCF tienen la ventaja sobre la terapia sistémica (dosis repetidas forzadas durante períodos más prolongados), ya que pueden proporcionar una administración continua de fármacos a concentraciones más altas y directamente en el sitio de la infección, con una liberación sostenida durante periodos prolongados. Además, los beneficios de estos sistemas incluyen un mejor cumplimiento en su uso por parte del paciente, reducción de efectos tóxicos y complicaciones sistémicas, como los efectos secundarios causados por antibióticos administrados sistémicamente (Magalhães Dias et al., 2019; Piñon-Segundo et al., 2019).

Debido al precio relativamente bajo, mayor estabilidad, resistencia mecánica, no toxicidad, biocompatibilidad, no inmunogenicidad y biodegradabilidad, las tecnologías de administración de fármacos comúnmente utilizadas incluyen el uso de polímeros en diversas formulaciones y formas, como nanosistemas (nanofibras, nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas), geles, micropartículas, micelas, etc., y han sido aplicadas en el ámbito de la odontología para la proporcionar concentraciones adecuadas de fármacos directamente en el sitio de acción (bolsa/tejido periodontal). Los principales polímeros utilizados para la preparación de estos sistemas se diferencian en tres grupos: a) Polímeros naturales (quitosano, dextrano, alginato y otros polisacáridos, ácido hialurónico, gelatina, poli(aminoácidos), entre otros); b) Polímeros

sintéticos degradables (poliésteres, resinas poliolefinicas, poliamidas, poliaminas, etc.); y c) Polímeros sintéticos no degradables (poliacrilatos, poldimetilsiloxano, etc.) (Chi et al., 2019; Piñon-Segundo et al., 2019; Uskokovi & Pej, 2022). Los polímeros sintéticos Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) y Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) son los polímeros de interés de este trabajo, debido a sus propiedades para la liberación de fármacos.

El PCL es un poliéster alifático semicristalino de carácter hidrofóbico, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA), biodegradable, no tóxico y de degradación lenta (Garzón et al., 2022). Por sus propiedades mecánicas es usado con otros polímeros en copolimerizaciones, potenciado su utilidad (Singhal, 2020), como el PLGA que está compuesto de dos proporciones diferentes de monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, es considerado un polímero biodegradable, biocompatible y de muy baja toxicidad, muy apropiado para sistemas de liberación en ambientes biológicos. Este polímero también está aprobado por la FDA como material compuesto de uso médico. Sin embargo, posee malas propiedades mecánicas, las cuales son mejoradas en la copolimerización con PCL. Por lo tanto, PCL y PLGA son complementarios en términos de propiedades mecánicas y de biodegradabilidad y conducen a obtener biomateriales de liberación controlada de fármacos con una mayor eficacia al ser combinados (Gao et al., 2019). La mezcla de PCL con PLGA podría ser una buena solución para superar la hidrofobicidad de PCL. PCL-PLGA muestran mayores propiedades hidrofílicas (Pawlik et al., 2019).

Ambos polímeros son utilizados en la realización de nanofibras para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral (Y. Wang et al., 2021). Las nanofibras pueden fabricarse mediante de la técnica Electrospinning (Electrohilado), la cual forma nanofibras continuas a partir de los polímeros en solución mediante la aplicación de un fuerte campo eléctrico. La solución polimérica se exprime por una jeringa y las altas fuerzas electrostáticas superan las fuerzas cohesivas, lo que da como resultado la formación de hilos poliméricos, con un alargamiento continuo bajo un movimiento de batido, evaporación del solvente y la formación de fibras de tamaño nanométrico (Stojanov & Berlec, 2020). Las nanofibras están diseñadas para mantener los fármacos en la boca y regular su liberación *in situ*. La fabricación de nanofibras ofrece la posibilidad de recargar varios fármacos o sustancias con actividad biológica a la vez, tiene una fácil adaptación en los sitios requeridos, tienen propiedades biomecánicas que se pueden adecuar a las condiciones de la cavidad oral, pueden ser más específicas y tener una mejor

adsorción. Además, su proceso de fabricación es reproducible y de bajo costo (Garzón et al., 2022).

Nanofibras de PCL y PCL-gelatina cargadas con metronidazol (antibiótico de amplio uso en el tratamiento de la periodontitis) tuvieron un efecto antibacteriano *in vitro* sobre *F. nucleatum*, siendo la PCL-gelatina más adecuada en la liberación del fármaco por más tiempo, con una liberación sostenida de hasta tres semana, controlada por la difusión y degradación de la gelatina (Zamani et al., 2010). En otro estudio se evaluó la capacidad la actividad antimicrobiana de nanofibras de PCL cargadas con Tetraciclina (antibiótico bacteriostático de amplio espectro para el tratamiento de la periodontitis) con Óxido de Zinc (ZnO). Dichas nanofibras liberaron la tetraciclina de manera sostenida hasta por 5 días, con baja toxicidad sobre fibroblastos y con actividad antimicrobiana contra el cultivo mixto de cuatro bacterias Gram-negativas anaerobias asociadas a periodontitis (Magalhães Dias et al., 2019). Es así que las nanofibras son una opción simple y promisoría para adaptar sustancias con actividad antimicrobiana en el tratamiento de la periodontitis.

1.4.2 Sustancias antimicrobianas

1.4.2.1 Anfotericina B (AMB)

Actualmente, se emplean tres grupos de antifúngicos para el tratamiento de infecciones por *Candida* spp.: a) Azoles (Fluconazol, Miconazol y Clotrimazol), b) Equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina) y c) Polienos (Anfotericina B – AMB y Nistatina) (Millsop & Fazel, 2016; Quindós et al., 2019). La AMB se ha destacado por ser un antifúngico fungicida con amplio espectro de acción contra hongos causantes de micosis sistémicas y generalmente su administración es por vía parenteral (Hamill, 2013) (Figura 3). Sin embargo, también es usada como terapia tópica de candidiasis orales, administrada en forma de crema, ungüento o loción por 14 días a 100mg/mL (Millsop & Fazel, 2016). Tiene como mecanismo de acción unirse al ergosterol de la membrana celular, provocando alteraciones de la permeabilidad con pérdida del contenido citoplasmático y lisis celular. Se ha reportado actividad antifúngica *in vitro* contra la mayoría de las especies de *Candida* asociadas a infecciones orales, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. dubliniensis* (Quindós et al., 2019).

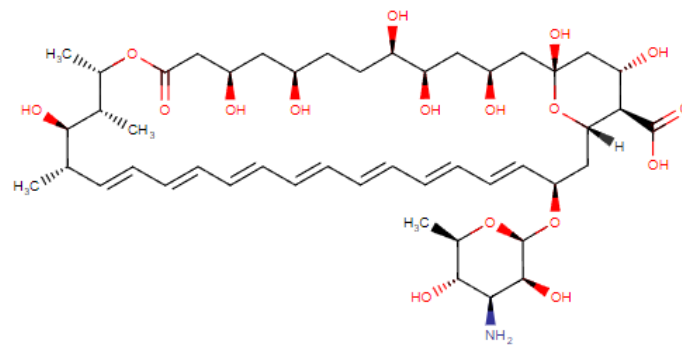


Figura 3. Estructura de la Anfotericina B (Formula: $C_{47}H_{73}NO_{17}$).
Tomado de <https://go.drugbank.com/>

Teniendo en cuenta la presencia *Candida* spp. en biopelículas polimicrobianas en pacientes con periodontitis, se plantea el uso de antifúngicos para inhibir la formación de dichas biopelículas. Estudios *in vitro* han determinado la susceptibilidad de diferentes especies de *Candida* obtenidas de muestras de lengua y placa subgingival de pacientes con periodontitis, hacia antifúngicos como AMB, fluconazol e itraconazol. *C. albicans* fue la especie más frecuente encontrada en ambas muestras y se observó una frecuencia baja de susceptibilidad al fluconazol e itraconazol, sin embargo, todos los aislamientos de ambos sitios fueron susceptibles a la AMB, demostrando la efectividad de este antifúngico sobre las levaduras relacionadas a la periodontitis (Radunovic et al., 2022). Aunado a esto, otros estudios han reportado la eficacia de AMB sobre a biopelículas formadas por *C. albicans*; un estudio demostró la actividad antifúngica de AMB con una $CMIB_{50}$ de $<1 \mu\text{g/mL}$ sobre biopelículas de 24 horas de maduración y con una $CMIB_{80}$ $>6 \mu\text{g/mL}$, independientemente del tiempo de maduración de la biopelícula (Valentín et al., 2007). También se reportó que las formulaciones lipídicas de AMB (CMI: $0.25 \mu\text{g/mL}$ de AMB liposomal y complejo lipídico AMB - ABLC) mostraron actividad contra biopelículas de *Candida* spp. (Kuhn et al., 2002).

Usando otras alternativas de administración, un estudio incorporó AMB y Clotrimazol en polimetilmetacrilato (PMMA), material base para la realización de prótesis dentales y determinaron el efecto inhibitor de ambos fármacos sobre la biopelícula producida por *C. albicans*, siendo más efectiva la AMB a bajas concentraciones (1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$) (AL-Janabi & Abdulkareem, 2018). Igualmente, nanofibras “core-shell” de núcleo de alcohol polivinílico, quitosano y AMB con cubierta de óxido de polietileno y gelatina mostraron mediante el ensayo de antibiograma una actividad antifúngica significativa contra diferentes especies de *Candida*, con zonas de inhibición de 14-26 mm y liberación del fármaco dentro de las 11 h con liberaciones

acumuladas finales del 71-78 %, sugiriendo que pueden actuar como un dispositivo de administración de fármacos adecuado para tratar infecciones fúngicas (Asgari et al., 2021).

1.4.2.2 Péptidos antimicrobianos: Lactoferricina B

El desarrollo de péptidos antimicrobianos ha tomado gran importancia en la generación de nuevas estrategias terapéuticas con el fin de combatir enfermedades infecciosas, dado principalmente al aumento de la resistencia microbiana a los antibióticos (H. Y. Wang et al., 2015). Los péptidos antimicrobianos (PAM) son componentes clave del sistema inmune innato de varios organismos, incluidos los humanos (Bechinger & Gorr, 2017) y colectivamente, estos tienen funciones biológicas que incluyen actividades inmunomoduladoras, antimicrobianas directas (antibacteriana, antifúngica, antiviral, etc.) y anti-biopelícula, según su estructura y parámetros biofísicos (Yang et al., 2019). Es así que estos péptidos y sus derivados sintéticos se han propuesto como enfoques alternativos en el tratamiento de diferentes infecciones (Torres et al., 2019) y han mostrado un efecto sinérgico con antibióticos clásicos neutralizando endotoxinas bacterianas. Además, es reconocido la capacidad de los AMP de actuar en diferentes etapas de la formación de biopelículas y con diferentes mecanismos de acción, como la regulación a la baja de moléculas del quorum-sensing (QS), eliminación de biopelículas preformadas, inhibición de la formación de biopelículas e inhibición de la adhesión (Chung & Khanum, 2017; Z. Wang et al., 2017). Se han descrito tres mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos: 1) Formación de un canal o poro acuoso en la membrana lipídica, favoreciendo el adelgazamiento de la membrana y la salida de componentes intracelulares de las bacterias; 2) Micelación o disolución de la membrana y 3) Traslocación a través de la membrana (Castañeda-casimiro et al., 2009; Torres et al., 2019; H. Y. Wang et al., 2015).

La síntesis química de derivados de péptidos antimicrobianos permite diseñar y obtener péptidos terapéuticos, seguros, con una secuencia determinada de aminoácidos, de obtención rápida y con una alta pureza (Vargas Casanova et al., 2019). Sin embargo, la actividad antibacteriana de los PAMs es susceptible a condiciones fisiológicas corporales, como las altas concentraciones de sal presentes en la saliva, suero y otros fluidos corporales, que interrumpen la interacción entre los PAMs y las bacterias (H. Y. Wang et al., 2015). Adicionalmente, los PAMs también pueden volverse ineficaces debido a diferentes mecanismos de defensa de las bacterias como son: 1) la acción proteolítica de enzimas secretadas, ejemplo de ello son las gingipainas producidas por *Porphyromonas gingivalis*, bacteria periodontopatógena; 2) La modificación de la carga superficial de la membrana externa o la pared celular de las bacterias, limitando la adhesión de

los PAMs; 3) Aquellos PAMs que actúan intracelularmente son susceptibles al flujo de salida activo, similar al mecanismo utilizado para resistir los antibióticos tradicionales; 4) La acción de los PAMs también puede verse afectada por la presencia de una matriz polimérica producida por las bacterias, limitando el acceso de los PAMs a la superficie celular bacteriana, ya sea por repulsión electrostática o por atrapamiento los péptidos; y 5) Se plantea la hipótesis de una posible resistencia cruzada de las bacterias a los péptidos endógenos de defensa del hospedero, después de la exposición de PAMs terapéuticos, sin embargo, esta resistencia a los PAMs se desarrolla en bajas frecuencias (Bechinger & Gorr, 2017). Por consiguiente, se hace necesario utilizar tecnologías de administración (SLCF) que permitan mejorar y proteger la actividad biológica de este tipo de moléculas.

Además, se debe tener claro el perfil de seguridad de los posibles PAMs terapéuticos, siendo necesario evaluar su potencial citotóxico sobre las células del hospedero. De tal forma que se hace necesario diseñar estrategias que permitan la obtención de PAMs sintéticos con una significativa acción antimicrobiana, sin repercutir en el hospedero, como la inclusión de aminoácidos no naturales, conjugación con azúcares, lípidos y proteínas, y síntesis de péptidos polivalentes (dímeros, tetrámeros, etc.) (Vargas Casanova et al., 2019).

Existen diferentes tipos de PAMs, uno de ellos agrupa a los péptidos aniónicos y catiónicos derivados de proteínas con actividad antibacteriana, como la Lactoferricina (Lfcin) producto de la Lactoferrina (LF), que es una glicoproteína de unión a hierro de ~ 80 kDa. Se encuentra predominantemente en los fluidos secretados de mamíferos como leche, lágrimas, saliva, fluido crevicular gingival, moco bronquial y plasma seminal, y se almacena en los gránulos secundarios de leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Gifford et al., 2005). Se ha reportado que LF suprime la adhesión y agregación de *Streptococcus gordonii* por secuestro de hierro, conduciendo a la inhibición del desarrollo de biopelículas orales (Arslan et al., 2009). Biopelículas formadas por *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* también fueron inhibidas a concentraciones bajas de LF (0.5-8 mg/mL) (Wakabayashi et al., 2009). Los péptidos derivados de LF como la Lfcin y la lactoferrampina (LFampin), fueron usados para construir un péptido heterodimérico (LFchimera), uniendo los péptidos LFcin17–30 y LFampin265–284 con una orientación estructural similar a la molécula nativa. Se demostró que LFchimera (50 µM) es capaz de inhibir la formación de biopelículas subgingivales multiespecies *in vitro* y reduce la viabilidad de bacterias en las biopelículas mejor que CHX y el clorhidrato de minociclina (MH) (Ruangcharoen et al., 2017).

La Lactoferricina (Lfcin) es un péptido cuya secuencia se encuentra localizada en la región N-terminal de la LF, se origina por hidrólisis enzimática, tiene una carga neta de +8 dada por la presencia de residuos de Arginina y Lysina, características anfipáticas, y posee una potente actividad antimicrobiana (Hao et al., 2018). Dentro de este grupo de Lfcinas, se encuentra la Lfcina B o Lactoferricina Bovina (LfcinB: ¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAP-SITC-VRRAF⁴¹) compuesta por 25 aminoácidos, posee actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral y antitumoral, atribuida al motivo mínimo RRWQWR presente en su estructura (Gifford et al., 2005; Vargas Casanova, 2018; Vargas Casanova et al., 2017, 2019) (Figura 4).

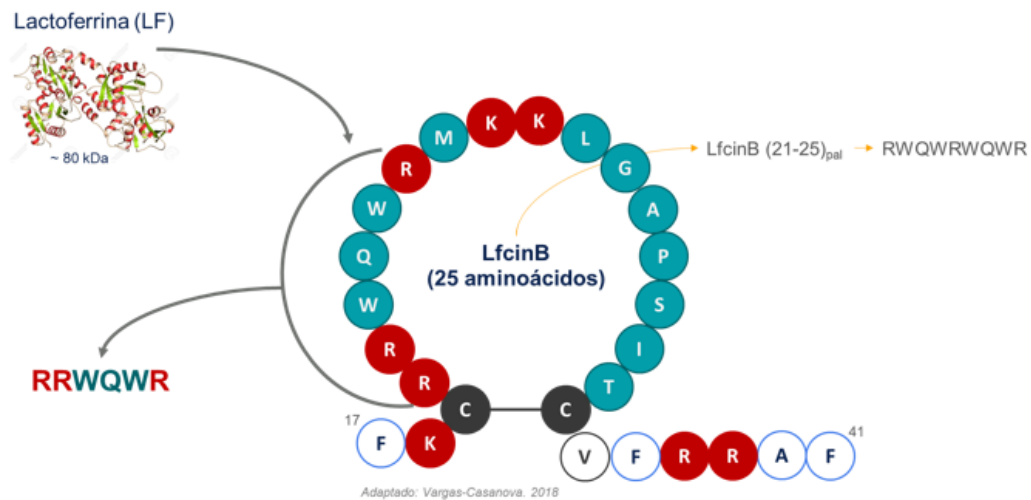


Figura 4. Estructura de la Lactoferricina B (LfcinB).
Adaptado de Vargas Casanova, 2018.

Las propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antitumorales y antivirales de los 25 residuos en LfcinB se han asociado con la porción rica en Triptofano/Arginina del péptido, mientras que las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras se han relacionado con una región cargada positivamente de la molécula. Se ha sugerido que esta región, similar a las alfa y beta-defensinas, puede actuar como una quimiocina y también, se ha sugerido las Lfcinas pueden translocarse espontáneamente a través de la membrana celular bacteriana de manera similar a los péptidos ricos en Arginina (Zarzosa-Moreno et al., 2020). Al respecto, se ha demostrado una significativa actividad antibacteriana de las secuencias dimérica de LfcinB (20–25)₂: (RRWQWR)₂K-Ahx, tetramérica de LfcinB (20–25)₄: (RRWQWR)₄K₂-Ahx₂-C₂, y palindrómica de LfcinB (21–25)_{Pal}: RWQWRWQWR a CMI de 5 a 135 µM, sobre bacterias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Vargas Casanova et al., 2019). Incluso se reportó la actividad fungistática y fungicida contra

Candida spp. de la secuencia LfcinB (21–25)_{Pal}, que además combinada con fluconazol exhibió un efecto antifúngico sinérgico contra *C. tropicalis* y *C. krusei* (Vargas-Casanova et al., 2020). Aunado a esto, se determinó la actividad antibacteriana de nanofibras realizadas con LfcinB (21–25)_{Pal} y Pullulan (polisacárido formado por unidades de maltotriosa) contra *E. coli*, con una liberación instantánea de la LfcinB. Estas nanofibras se obtuvieron mediante Electrospinning, sin afectar la integridad del péptido (Román et al., 2019).

1.4.2.3 Óxido de Zinc (ZnO)

Entre los óxidos metálicos de tamaño nanométrico, el ZnO se destaca debido a sus propiedades, como una alta relación área superficial/volumen, material rentable y estabilidad ambiental prolongada, además de ser usado ampliamente por sus actividades biológicas, como una sustancia antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, antidiabética, etc. El ZnO muestra un alto rango de absorción óptica en UVA (400 nm-315nm) y región UVB (315nm-280 nm) que mejora su propiedad antibacteriana (Mahamuni-Badiger et al., 2020). Es considerado bacteriostático y su actividad antibacteriana se atribuye a tres mecanismos de acción: a) Tiene la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) en su superficie; b) Genera ruptura de la membrana celular después del contacto e interactúa con el contenido intracelular; c) Acción antimicrobiana por liberación de iones Zn^{2+} a partir de ZnO en medio acuoso. Las bacterias Gram-positivas son menos sensibles al daño debido a los iones Zn^{2+} , debido a que el atrapamiento de estos iones en la capa gruesa de peptidoglucano con carga negativa causa menos toxicidad que la de las bacterias Gram-negativas, que tiene una capa más delgada de peptidoglucano, y por lo tanto, menor resistencia a la internalización de nanopartículas de ZnO (Magalhães Dias et al., 2019; Mahamuni-Badiger et al., 2020).

Se ha demostrado específicamente que el ZnO tiene la capacidad de eliminar microorganismos de la cavidad oral asociados a caries, incluso, las nanopartículas de ZnO son más eficaces contra las bacterias gramnegativas y grampositivas, que las partículas de mayor tamaño (Sevinç & Hanley, 2010). Concentraciones de ZnO entre 0.25 - 2.5 mg/mL logra inhibir el crecimiento de bacterias implicadas en infecciones orales, incluyendo *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* (Allaker, 2012). Además, la incorporación de nanopartículas de ZnO en Poli-Metilmacrilato (PMMA) mostró actividad antifúngica contra biopelículas de 24 a 48 horas formadas por *C. albicans*, mediante el estrés oxidativo de las células (Ciarech et al., 2016).

Otros estudios han logrado demostrar la actividad antimicrobiana del ZnO a partir del uso de materiales odontológicos como resinas o selladores. Las nanopartículas de ZnO logran reducir el crecimiento de biopelículas de *S. sobrinus* o la acumulación de placa a concentraciones no menores de 10 % p/p en una formulación a base de resina, en un periodo de 3 días. Además, se logró determinar que la incorporación de nanopartículas de quitosano y nanopartículas de ZnO en un sellador de conductos radiculares mejora las propiedades antibacterianas (Piñon-Segundo et al., 2019). Incluso se ha incorporado nanopartículas de ZnO en nanofibras de PCL y PCL/Gel, las cuales mostraron actividad antimicrobiana contra cepas de referencia de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, con una citocompatibilidad satisfactoria, es decir, baja actividad citotóxica sobre células madre de pulpa dental humana (Münchow et al., 2015). Resultados similares se reportaron de membranas tipo regeneración tisular guiada (Guided Tissue Regeneration - GTR) realizadas con PCL y nanopartículas de ZnO mediante Electrospinning. La incorporación de nanopartículas de ZnO al 0,5 % (p/v) proporcionó efectos antibacterianos contra *P. gingivalis* ATCC 33277, al tiempo que apoyaba la viabilidad y la osteodiferenciación de las células madre del ligamento periodontal, sin afectar negativamente su característica de biocompatibilidad, convirtiendo la membrana en un candidato prometedor para regular el entorno inflamatorio y promover la formación ósea en la regeneración periodontal (Nasajpour et al., 2018). En este mismo contexto las nanofibras de PCL incorporadas con nanopartículas de tetraciclina con y sin ZnO, mencionadas anteriormente, mostraron una liberación controlada y sostenida del antibiótico en presencia de ZnO con una tasa de liberación de 3.7 µg/mL de 1 a 4 horas, niveles más altos que los obtenidos mediante la administración sistémica del antibiótico (Magalhães Dias et al., 2019).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.5 Planteamiento del problema

La periodontitis es una enfermedad infecciosa e inflamatoria crónica multifactorial que afecta al 73% de la población colombiana (Ministerio de Salud y Protección Social & MINSALUD, 2014), al 91.7% de la población en Brasil (Palma & Leite, 2014) y aproximadamente el 50% de la población adulta en el mundo (Genco & Sanz, 2020). La tasa de prevalencia estandarizada por edad global aumentó en un 8.4% de 1990 a 2019 (M. X. Chen et al., 2021). Esta enfermedad es causada por la presencia y diferencias en la abundancia de las comunidades microbianas patógenas, denominadas microbiota disbiótica, organizadas en biopelículas estratificadas (Haffajee et al., 2008) que provocan una respuesta inflamatoria crónica del tejido periodontal, que resulta en la formación de bolsas periodontales, pérdida progresiva de inserción periodontal con destrucción de los tejidos blandos y duros de soporte periodontal, y posterior pérdida de los dientes (Hajishengallis & Korostoff, 2017). La formación de biopelículas en la periodontitis está asociada principalmente a bacterias periodontopatógenas (Colombo & Tanner, 2019), no obstante, en los últimos años se han reportado casos, con presencia de levaduras del género *Candida* spp., cumpliendo un papel importante en la progresión de esta enfermedad (Canabarro et al., 2013). El estímulo microbiano en los tejidos periodontales desencadena una respuesta inflamatoria inicialmente local, que puede volverse crónica y generar una respuesta inflamatoria sistémica, que se considera un factor de riesgo para patologías como la Enfermedad Cardiovascular, Diabetes Mellitus, Artritis, Osteoporosis y Apnea Obstructiva del Sueño (AOS) (Latorre et al., 2018). La AOS es un trastorno respiratorio del sueño que obstruyen la vía aérea impidiendo el paso de aire (Ralls & Grigg-Damberger, 2012). Representa un serio problema de salud pública en varios países del mundo, debido a que también es un factor de riesgo para Enfermedades Cardiovasculares, Mentales y Síndromes metabólicos (Otero et al., 2016).

La relación entre AOS y la periodontitis aún no se ha dilucidado completamente, el mecanismo fisiopatológico, causa-efecto aún no está claro. Se necesitan más estudios donde tengan en cuenta una clasificación precisa de los individuos con AOS y además, hagan uso de un método estandarizado para el diagnóstico de la periodontitis, de acuerdo con el nuevo sistema de clasificación y estadificación de la periodontitis (Lembo et al., 2021). Sin embargo, se han sugerido diversos mecanismos que involucran factores genéticos, inmunológicos y microbiológicos (T. S. Al-Jewair et al., 2015). Se plantea que la inflamación sistémica puede ser el vínculo de asociación entre la periodontitis y AOS, la sequedad oral presente en los pacientes con AOS aumenta el riesgo de infecciones bacterianas y fúngicas, disminuye la habilidad del

sistema inmune para responder a las infecciones, altera la remodelación ósea estimulada por la hipoxia y aumentan los niveles de CO₂, lo que permitiría la colonización y modulación de la microbiota disbiótica polimicrobiana (Nizam et al., 2016).

Los cambios ambientales de la cavidad oral a causa de la AOS, permitirían cambios en la presencia y abundancia de diferentes microorganismos, no solo bacterianos sino también levaduriformes (Janus et al., 2017; Vieira Colombo et al., 2016). Estos microorganismos tienen la capacidad de formar biopelículas polimicrobianas en el surco gingival, donde la presencia de *Candida* spp., podría cumplir un papel importante en la progresión de la periodontitis, por su capacidad de colonizar tejido gingival en mayor proporción (Arumugam, 2015; Canabarro et al., 2013; Tamai et al., 2011). Además, dado que la presencia e incremento de marcadores inflamatorios sistémicos como las citocinas proinflamatorias pueden ser el vínculo de asociación entre la periodontitis y la AOS, puesto que activan al osteoclasto para favorecer la reabsorción ósea local en la enfermedad periodontal, es así que también se hace importante ampliar el conocimiento sobre la relación de los procesos inflamatorios de ambas patologías a nivel local en saliva y fluido crevicular, y su relación con la microbiota disbiótica presente.

Todos estos factores pueden considerarse un riesgo significativo en la persistencia de infecciones, teniendo en cuenta que la principal medida terapéutica para el tratamiento de la periodontitis, es el uso de regímenes empíricos de antibióticos de amplio espectro, dirigidos solo a una o dos especies bacterianas (H. Y. Wang et al., 2015), y el uso de protocolos agresivos de desbridamiento o raspaje mecánico del tejido infectado (Graziani et al., 2017), los cuales no están dirigidos a contrarrestar la infección con presencia de hongos levaduriformes (Feres et al., 2015).

Por lo tanto, se deben plantear nuevas estrategias terapéuticas, las cuales tengan en cuenta la presencia de levaduras y bacterias con el fin de inhibir o eliminar las biopelículas polimicrobianas disbióticas relacionadas a la periodontitis asociada a AOS. Dichas biopelículas plantean un desafío adicional, debido a que requieren antimicrobianos que sean efectivos contra todos los microorganismos patógenos presentes en la biopelícula, incluso sobre la matriz de polímeros extracelulares (EPS), la cual le confiere mayor complejidad, por su poca permeabilidad a sustancias antimicrobianas (Koo et al., 2017). Debido a esto se considera el uso de antifúngicos como la Anfotericina B, usada frecuentemente para micosis sistémicas, ya que presenta un amplio espectro de acción, y ha demostrado ser eficaz frente a biopelículas formadas por *C. albicans* (Fernández-Rivero et al., 2017), junto al uso de un péptido antimicrobiano como la Lactoferrina Bovina (LfcinB) que en su secuencia contiene un motivo mínimo (RRWQWR) con

actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, e incluso posee actividad antifúngica (Vargas-Casanova et al., 2020; Vargas Casanova et al., 2019). Esto unido a la implementación de tecnologías para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos que permitan mejorar la biodisponibilidad y retención de los agentes antimicrobianos en las superficies orales y dentro de las biopelículas. Dentro de los sistemas de liberación que han mostrado ser seguros y eficaces se encuentran las nanofibras capaces de almacenar y liberar de manera constante y prolongada sustancias antimicrobianas sobre las biopelículas.

Es así, que este tipo de estructuras pueden ser consideradas como una herramienta eficaz para la administración *in situ* de agentes antimicrobianos, que permitan inhibir la formación de estructuras complejas de difícil penetración como las biopelículas polimicrobianas causantes de enfermedades como la periodontitis asociada a AOS. Por todo lo anterior, esta tesis doctoral pretendió determinar el perfil microbiano e inmunológico presente en individuos con periodontitis y AOS, con el fin de establecer un modelo de biopelícula polimicrobiano *in vitro* relacionado a ambas condiciones y determinar la actividad antimicrobiana y anti-biopelícula de nanofibras incorporadas con Anfotericina B, un péptido antimicrobiano palindrómico de Lactoferricina B (Lfcin B (21-25)_{pal}) y Óxido de Zinc (ZnO), como una herramienta eficaz para el tratamiento local de la periodontitis, desencadenada por trastornos como la AOS.



PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la acción antimicrobiana de nanofibras cargadas con Anfotericina B (AMB), péptido palindrómico de Lactoferricina B (LfcinB (21-25)_{pal}) y Óxido de Zinc (ZnO) sobre la formación de biopelículas polimicrobianas *in vitro* relacionadas con Periodontitis y Apnea Obstructiva del Sueño?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar un sistema de liberación controlada de fármacos, nanofibras cargadas con Anfotericina B (AMB), un péptido antimicrobiano palindrómico de Lactoferricina B (LfcinB (21-25)_{pal}) y Óxido de Zinc (ZnO) para inhibir la formación de biopelículas polimicrobianas *in vitro* relacionadas con Periodontitis asociada a Apnea Obstructiva del Sueño.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar los microorganismos cultivables en saliva, placa subgingival y FCG y cuantificar las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-33 y TNF- α) en saliva y FCG en individuos con Periodontitis y AOS.
2. Establecer un modelo de biopelícula polimicrobiana *in vitro* con microorganismos identificados en las muestras orales de individuos con Periodontitis y AOS.
3. Establecer la actividad biológica *in vitro* (anti-biopelícula y citotóxica) de las nanofibras cargadas con AMB/LfcinB (21-25)_{pal}/ZnO.
4. Determinar las características fisicoquímicas de nanofibras cargadas con AMB/LfcinB (21-25)_{pal}/ZnO con actividad anti-biopelícula.
5. Realizar una prospección tecnológica del uso de las nanofibras cargadas con AMB/LfcinB (21-25)_{pal}/ZnO con actividad anti-biopelícula.

Los objetivos específicos se desarrollaron en tres fases presentadas en cuatro capítulos:

Fase 1 (Capítulo 1 y 2): Objetivo 1.

Fase 2 (Capítulo 3): Objetivos 2, 3 y 4.

Fase 3 (Capítulo 4): Objetivo 5.



DESARROLLO

4. DESARROLLO

4.1 Capítulo 1.

4.1.1 Descripción artículos 1 y 2:

Artículo 1: Los pacientes con apnea obstructiva del sueño pueden favorecer los factores predisponentes de periodontitis por la presencia de *P. melaninogenica* y *C. albicans*, aumentando la severidad de la enfermedad periodontal

Con el fin de comprender la relación microbiológica entre la periodontitis y la AOS, se propuso analizar la microbiota oral cultivable de individuos con AOS y su asociación con la condición periodontal. Adicionalmente, se propuso obtener los microorganismos más frecuentes y con mayor asociación a ambas patologías, para realizar un banco de trabajo para el establecimiento de biopelículas polimicrobianas *in vitro*. La identificación de los microorganismos se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOF-MS, a partir de muestras de saliva, placa subgingival y surco gingival de 93 individuos clasificados en cuatro grupos según el diagnóstico clínico: Grupo 1 (H) (25 individuos sanos), Grupo 2 (P) (17 individuos con periodontitis), Grupo 3 (OSA) (19 individuos con AOS) y Grupo 4 (P-OSA) (32 individuos con periodontitis y con AOS). Este es el primer reporte con respecto a la caracterización de la microbiota oral de individuos con periodontitis asociada a AOS mediante el uso de MALDI-TOF-MS como herramienta de identificación rápida de los microorganismos presentes en muestras de cavidad oral; saliva, placa subgingival y surco gingival, para evaluar las diferencias en la microbiota oral de sujetos con y sin periodontitis y con y sin Apnea Obstructiva del Sueño.

A partir del análisis de los datos demográficos, historia clínica y parámetros periodontales de los individuos, se evidenció que existe un efecto del estadio de la periodontitis en presencia de la AOS, siendo la Periodontitis Estadio III, la de mayor presencia en pacientes con AOS severa, con más casos en hombres. Se cuantificó la abundancia relativa de los microorganismos según la clasificación por categorías basadas en los complejos microbianos establecidos por Socransky (S. S. Socransky et al., 1998), adicionando tres categorías que incluyeron *Candida* spp., *Lactobacillus* spp. y Otros microorganismos.

La microbiota oral cultivable se alteró en pacientes con periodontitis y con AOS (Grupo 4 P-OSA), en términos de diversidad y aumento de microorganismos como bacterias periodontopatógenas y *Candida* spp., siendo *Candida albicans* la especie más prevalente. A su vez, la mayor

distribución de los complejos y categorías se encontró en las muestras orales de estos mismos individuos. Es así que se determinó un conjunto de 24 microorganismos más frecuentes, con una presencia de más del 10% de los individuos evaluados y se distribuyeron de la siguiente manera:

- Complejo amarillo: *S. anginosus*, *S. cristatus*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. salivarius* y *S. sanguinis*.
- Complejo azul: *A. georgiae*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* y *A. oris*.
- Complejo púrpura: *V. parvula*.
- Complejo verde: *C. ochracea*.
- Complejo naranja: *F. nucleatum*, *P. micra* y *P. melaninogenica*.
- *Candida* spp.: *C. albicans*.
- *Lactobacillus* spp.: *L. paracasei*.
- Otros microorganismos: *B. dentium*, *C. granulosum* y *S. epidermidis*.

Mediante un análisis de Escalamiento Multidimensional (MDS) establecido de acuerdo a la disimilaridad (matrices de distancia euclídea), este conjunto de microorganismos se agrupó en seis clusters, sobresaliendo el cluster conformado por *A. georgiae*, *P. melaninogenica* y *C. albicans*, quienes definieron positivamente las dimensiones 1 y 2. Caso contrario de *C. ochracea*, la cual definió la dimensión 3 con una modulación negativa.

La presencia de las dos patologías se asoció con los microorganismos del complejo naranja y rojo, junto a *Candida* spp., los cuales se correlacionaron positivamente con el porcentaje de biopelícula en los individuos con ambas patologías. La presencia de estos microorganismos podría explicar la alta prevalencia de casos de periodontitis en estadio III en pacientes con AOS severa. Por consiguiente, nuestro estudio propone una nueva hipótesis: en presencia de ambas enfermedades (P-OSA), los microorganismos oportunistas como *Candida* spp., pueden tener un comportamiento que permita la colonización de bacterias periodontopatógenas, teniendo en cuenta que se ha demostrado a través de estudios *in vitro*, que *C. albicans* modula el microambiente, provocando condiciones anóxicas, favoreciendo el crecimiento de bacterias estrictamente anaerobias y promoviendo sinérgicamente la formación de biopelículas disbióticas.

Así pues, basados en estos resultados se propone establecer la formación de biopelículas polimicrobianas *in vitro*, conformadas por un conjunto de microorganismos seleccionados a partir de los 24 microorganismos analizados, para evaluar la actividad antimicrobiana de las nanofibras. Se eligieron un total de diez microorganismos, los cuales se lograron aislar y purificar de las

muestras de cavidad oral: *S. salivarius*, *S. gordonii*, *A. odontolyticus*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. melaninogenica*, *C. albicans*, *L. paracasei* y *C. granulosum*. *P. gingivalis* también fue incluida teniendo en cuenta su rol como bacteria periodontopatógena.

Artículo 2: Microbiota oral críptica: ¿Cuál es su papel como patógenos periodontales relacionados con la AOS?

Teniendo en cuenta que la periodontitis se ha relacionado comúnmente con bacterias categorizadas en los complejos microbianos de Socransky, se consideró que existe una falta de conocimiento sobre "otros microorganismos", que rara vez se consideran patógenos orales significativos y no están previamente categorizados, ni conectados a enfermedades en la cavidad oral. Estos microorganismos fueron identificados en las muestras orales de los individuos evaluados y fueron denominados como "microorganismos crípticos".

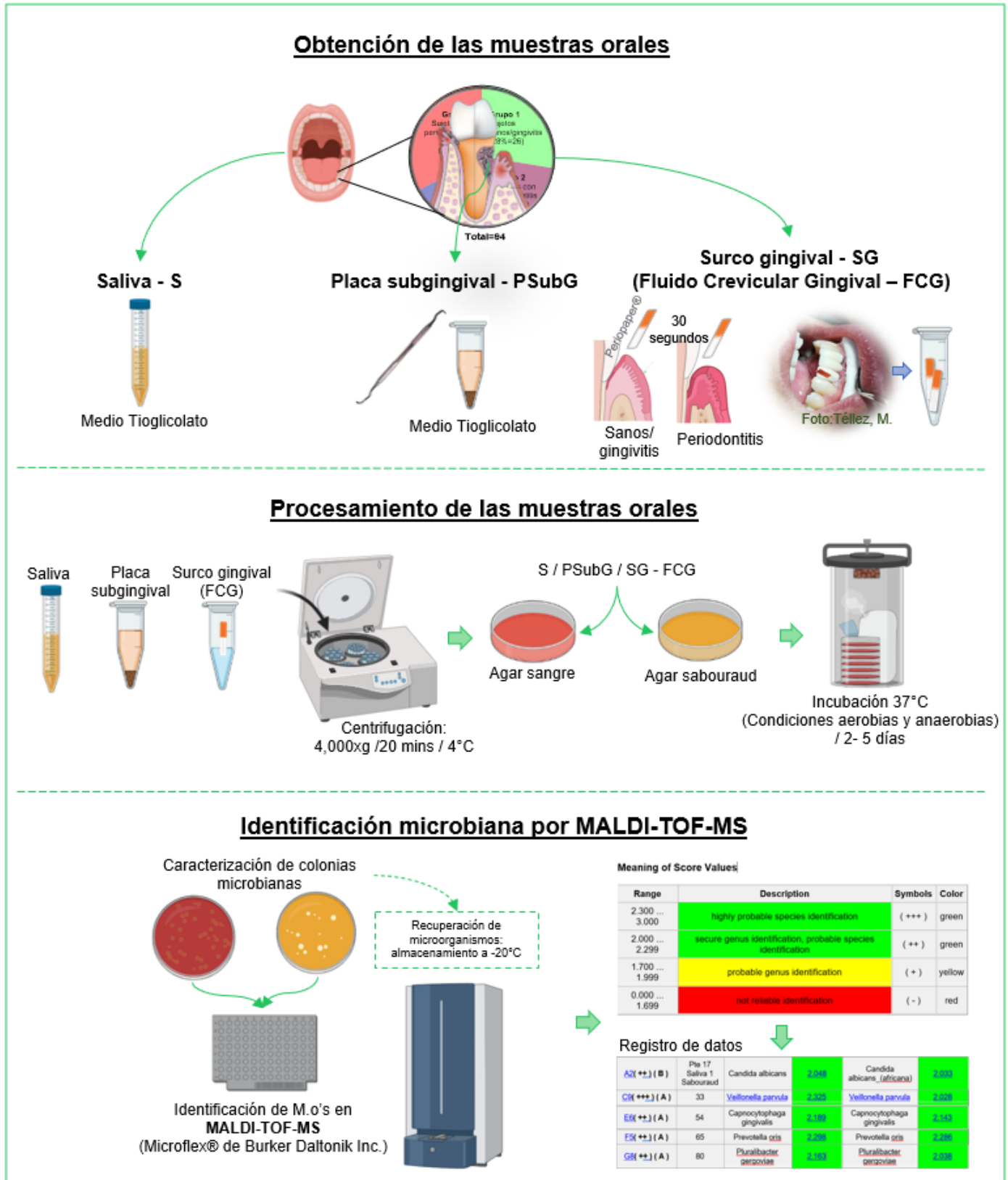
Por tal motivo, este estudio planteó la hipótesis de que estos microorganismos crípticos podrían contribuir a la modulación de la microbiota oral presente en la salud o la enfermedad (pacientes con periodontitis y/o AOS). Para ello, se identificó la presencia y la correlación entre estos microorganismos orales crípticos cultivables y se determinó su posible papel en ambas condiciones. Se registraron datos demográficos, características clínicas orales, géneros y especies de microorganismos orales crípticos cultivables, identificados por MALDI-TOF. Se analizaron los datos de 75 participantes a quienes se les identificaron microorganismos crípticos, determinando las frecuencias relativas del género y la especie, se realizaron grupos microbianos y pruebas de correlaciones.

De acuerdo con la condición periodontal, se encontró que la Gingivitis inducida por biopelícula en periodonto reducido y la Periodontitis estadio III tienen la mayor diversidad de especies de microorganismos crípticos. Con base en la condición experimental estos hallazgos mostraron que existen géneros relacionados con condiciones de enfermedad y otros relacionados con condiciones de salud, destacándose especies que podrían estar relacionadas con diferentes enfermedades crónicas, como comorbilidades compartidas entre periodontitis y AOS. Mientras que *Gemella* spp. se asoció a condiciones de salud, *Cutibacteria* spp., *Propionibacterium* spp. y *Bifidobacterium* spp. estaban asociados a perfiles de enfermedad. El género *Staphylococcus* spp. fue prevalente en individuos con y sin periodontitis y con y sin ASO, no obstante, su presencia fue variable y posiblemente dependiente de la presencia de otros microorganismos. Se descubrió

que el perfil de enfermedad contenía microorganismos que podrían clasificarse como posibles patógenos y podrían tener un papel en la interacción entre la AOS, la periodontitis y otros trastornos crónicos clínicamente significativos o enfermedades infecciosas sistémicas.

Debido esto, es posible proponer que los microorganismos crípticos dentro la microbiota oral de pacientes con periodontitis y con AOS serían patógenos potenciales, promoviendo el desarrollo de una microbiota disbiótica y la posible aparición de enfermedades crónicas, que previamente se han propuesto como factores de riesgo comunes para ambas condiciones. Este estudio abre las puertas a nuevas investigaciones para comprender la función de posibles patógenos en la microbiota oral.

Figura 5. Desarrollo metodológico Artículo 1 y 2



4.1.1.1 Artículo 1



OPEN ACCESS

EDITED BY
Zheng Zhang,
Nankai University, China

REVIEWED BY
Yuichiro Noiri,
Niigata University, Japan
Maria D'Accolti,
University of Ferrara, Italy

*CORRESPONDENCE
Claudia M. Parra-Giraldo
claudia.parra@javeriana.edu.co

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Microbiome in Health and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

RECEIVED 02 May 2022
ACCEPTED 10 August 2022
PUBLISHED 15 September 2022

CITATION
Télez-Corral MA, Herrera-Daza E,
Cuervo-Jimenez HK,
Arango-Jimenez N, Morales-Vera DZ,
Velosa-Porras J, Latorre-Uriza C,
Escobar-Arregoces FM,
Hidalgo-Martinez P, Cortés ME,
Roa-Molina NS, Otero L and
Parra-Giraldo CM (2022) Patients with
obstructive sleep apnea can favor the
predisposing factors of periodontitis
by the presence of *P. melaninogenica*
and *C. albicans*, increasing the severity
of the periodontal disease.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:934298.
doi: 10.3389/fcimb.2022.934298

COPYRIGHT
© 2022 Télez-Corral, Herrera-Daza,
Cuervo-Jimenez, Arango-Jimenez,
Morales-Vera, Velosa-Porras,
Latorre-Uriza, Escobar-Arregoces,
Hidalgo-Martinez, Cortés, Roa-Molina,
Otero and Parra-Giraldo. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use,
distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Patients with obstructive sleep apnea can favor the predisposing factors of periodontitis by the presence of *P. melaninogenica* and *C. albicans*, increasing the severity of the periodontal disease

Mayra A. Télez-Corral^{1,2,3}, Eddy Herrera-Daza⁴,
Hayde K. Cuervo-Jimenez², Natalia Arango-Jimenez⁵,
Darena Z. Morales-Vera⁵, Juliana Velosa-Porras¹,
Catalina Latorre-Uriza^{1,5}, Francina M. Escobar-Arregoces^{1,5},
Patricia Hidalgo-Martinez⁶, Maria E. Cortés³,
Nelly S. Roa-Molina¹, Liliana Otero¹
and Claudia M. Parra-Giraldo^{2*}

¹Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia, ²Unidad de Investigación en Proteómica y Micosis Humanas, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia, ³Facultade de Odontología, Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ⁴Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia, ⁵Periodoncia, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia, ⁶Clinica del Sueño, Hospital Universitario San Ignacio y Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

Objective: The aim of this study was to analyze the cultivable oral microbiota of patients with obstructive sleep apnea (OSA) and its association with the periodontal condition.

Methods: The epidemiology profile of patients and their clinical oral characteristics were determined. The microbiota was collected from saliva, subgingival plaque, and gingival sulcus of 93 patients classified into four groups according to the periodontal and clinical diagnosis: Group 1 ($n = 25$), healthy patients; Group 2 ($n = 17$), patients with periodontitis and without OSA; Group 3 ($n = 19$), patients with OSA and without periodontitis; and Group 4 ($n = 32$), patients with periodontitis and OSA. Microbiological samples were cultured, classified, characterized macroscopically and microscopically, and identified by MALDI-TOF-MS. The distribution of complexes and categories of microorganisms and correlations were established for inter- and intra-group

of patients and statistically evaluated using the Spearman r test (p -value <0.5) and a multidimensional grouping analysis.

Result: There was no evidence between the severity of OSA and periodontitis ($p = 0.2813$). However, there is a relationship between the stage of periodontitis and OSA ($p = 0.0157$), with stage III periodontitis being the one with the highest presence in patients with severe OSA (prevalence of 75%; $p = 0.0157$), with more cases in men. The greatest distribution of the complexes and categories was found in oral samples of patients with periodontitis and OSA (Group 4 P-OSA); even *Candida* spp. were more prevalent in these patients. Periodontitis and OSA are associated with comorbidities and oral conditions, and the microorganisms of the orange and red complexes participate in this association. The formation of the dysbiotic biofilm was mainly related to the presence of these complexes in association with *Candida* spp.

Conclusion: Periodontopathogenic bacteria of the orange complex, such as *Prevotella melaninogenica*, and the yeast *Candida albicans*, altered the cultivable oral microbiota of patients with periodontitis and OSA in terms of diversity, possibly increasing the severity of periodontal disease. The link between yeasts and periodontopathogenic bacteria could help explain why people with severe OSA have such a high risk of stage III periodontitis. Antimicrobial approaches for treating periodontitis in individuals with OSA could be investigated *in vitro* using polymicrobial biofilms, according to our findings.

KEYWORDS

cultivable oral microbiota, periodontitis, obstructive sleep apnea, MALDI-TOF-MS, *Candida albicans*

Introduction

Periodontitis is a chronic infectious disease that affects approximately 50% of adults in the world (Genco and Sanz, 2020). This infection is caused by pathogenic microbial communities known as dysbiotic microbiota. The dysbiotic microbiota produce an inflammatory response of the periodontal tissue resulting in the formation of periodontal pockets, progressive loss of periodontal attachment with the destruction of soft and hard supporting periodontal tissues, and loss of teeth (Hajishengallis and Korostoff, 2017).

This dysbiotic microbiota was described by Socransky (Socransky et al., 1998) who identified genera of microorganisms with certain pathogenicity factors that facilitate the colonization of periodontal tissue. In this way, he proposed six microbial complexes present in subgingival plaque recognized by colors: the yellow complex (*Streptococcus* spp.), the blue complex (*Actinomyces* spp.), the purple complex (*Veillonella* spp.), the green complex (*Eikenella* spp., *Capnocytophaga* spp., and *Campylobacter* spp.), the orange

complex (*Eubacterium* sp., *Fusobacterium* spp., *Parvimonas* sp., *Prevotella* spp., *Slackia* sp., and *S. constellatus*), and the red complex (*Porphyromonas* sp., *Tanarella* sp., and *Treponema* sp.). The last two complexes are recognized for grouping the bacteria considered periodontal-pathogenic. Therefore, the periodontal-pathogenic dysbiotic microbiota, which is mostly bacterial, is strongly related to periodontitis as a determining factor in the inflammatory reaction of the periodontal tissues that results in systemic inflammatory events. (Lamont et al., 2018), triggering an exacerbated chronic inflammatory response, which is associated with systemic diseases, such as cardiovascular diseases (CVDs) (Bui et al., 2019), diabetes mellitus (Escobar et al., 2014), and obstructive sleep apnea (OSA) (Gamsiz-Isik et al., 2017).

OSA is a sleep-disordered breathing that occurs when the soft tissues around the upper airway collapse, partially or completely obstructing airflow despite the increased ventilatory effort. It is probably the most common sleep respiratory disorder in adults. OSA is more prevalent in men, and it becomes similar in both sexes after menopause (Ruiz et al.,

2016; Hidalgo-Martínez and Lobelo, 2017). In recent years, OSA has been related to periodontitis. Previous studies have shown that people with OSA have a higher risk of severe periodontitis than people without sleep apnea and that periodontitis is more frequent in young adults with mild OSA (Gunaratnam et al., 2009; Seo et al., 2013; Sanders et al., 2015; Cuervo et al., 2016).

Different mechanisms involving genetic, immunological, and microbiological factors (Al-Jewair et al., 2015; Cade et al., 2016; Nizam et al., 2016; Zhang et al., 2021) have been suggested for the cause-effect relationship between OSA and periodontitis. The genetic predisposition, the inflammatory response shared in both diseases (Nizam et al., 2016), and the oral dryness (Seo et al., 2013) have been described among the hypotheses proposed to explain the increase in periodontitis in patients with OSA. Oral dryness decreases the ability of the immune system to respond to infections, alters bone remodeling stimulated by hypoxia, and increases CO₂ levels (Nizam et al., 2016), enabling an environment that allows the colonization of a different polymicrobial and dysbiotic microbiota, in such a way that there may be a synergistic effect among these factors. Consequently, environmental changes in the oral cavity due to the relationship between periodontitis and OSA would allow associations of bacteria and yeasts (Vieira Colombo et al., 2016; Janus et al., 2017), which can form polymicrobial biofilms in the gingival sulcus. An *in vitro* study showed that *Porphyromonas gingivalis*' InlJ protein and *Candida albicans*' hyphal protein Als3 facilitate the adhesion between the two microorganisms and cause significant changes in gene expression by *P. gingivalis*, thereby increasing the pathogenic potential of this bacteria (Sztukowska et al., 2018). In addition, a study revealed that *C. albicans* biofilms encourage the growth of anaerobic bacteria by removing the oxygen that is present and creating a hypoxic microenvironment (Fox et al., 2014).

Therefore, the presence of *Candida* spp. could play an important role in the progression of periodontitis due to its ability to colonize gingival tissue in greater proportion (Tamai et al., 2011; Canabarro et al., 2013; Arumugam, 2015). However, some authors still consider that there is little evidence for the association between periodontitis and OSA, the pathophysiological mechanisms, and the cause-effect relationship between both pathologies (Lembo et al., 2021). Then, it is necessary to start with a periodontal clinic analysis of the microbiological aspects present in patients with these pathologies and their relationship with the periodontal condition and the systemic factors that the patients are exposed to.

Proteomic tools such as Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) allow the identification of microorganisms from libraries that store the mass spectrum of their cytoplasmic proteins, especially chaperones and ribosomal proteins. This technology allows the quick identification of up to 200 microorganisms as

bacteria and yeasts, both aerobic and anaerobic (Barberis et al., 2014; Antezack et al., 2020). In this study we used MALDI-TOF MS to determine the microbial composition of cultivable oral microbiota (yeast and bacteria) in patients with OSA and its association with the periodontal condition.

Materials and methods

Patients/study population

A convenience sample of 93 eligible participants that fulfilled the inclusion criteria (56 women and 37 men aged 30–72 years) were enrolled from the Sleep Clinic of the *Hospital Universitario San Ignacio* and the Sleep Clinic of the Faculty of Dentistry at the *Pontificia Universidad Javeriana-PUJ*, Bogotá, D.C., Colombia with a polysomnographic diagnosis for OSA, and were included in the present study between April 2019 and March 2021. This study was carried out following the Declaration of Helsinki of 1975 revised in 2000 and approved by the Research and Ethics Committee of the Faculty of Dentistry at the *Pontificia Universidad Javeriana-PUJ* (CIEFOUJ 016B). Informed consent was obtained from all patients after the explanation of conditions and before their clinical examination.

The inclusion criteria were as follows: (1) adults over 30 years old; (2) having at least six teeth in their mouth; and (3) having a polysomnographic study done no more than 6 months before. The exclusion criteria were as follows: (1) smoker; (2) diabetic; (3) having taken antibiotics in the last 3 months; (4) no previous periodontal treatment in the last 3 months; (5) treated with continuous positive airway pressure (CPAP) or bilevel positive airway pressure (BPAP); and (6) having received a pharmacological or surgical treatment for OSA.

All patients were diagnosed by a sleep medicine pulmonologist. The apnea-hypopnea index (AHI) described in the polysomnogram was used to determine the presence and severity of OSA. AHI was calculated as the total number of apneas and hypopneas per hour of sleep. The occurrence of OSA was determined with an AHI score >5; mild OSA with an AHI of 5–15; moderate OSA with an AHI of 16–30; and severe OSA with an AHI >30 (Sateia, 2014). To determine the presence of periodontitis, all patients were examined at the clinic of the Faculty of Dentistry of the PUJ. Panoramic x-rays of each patient were taken and then the specialists in periodontics followed the same protocol to make the periodontal diagnosis of periodontitis stages I, II, III, and IV according to the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions (Caton et al., 2018). Periodontal probing was performed by two calibrated periodontists who used a North Carolina (Hu-Friedy®) probe to determine the insertion level, the gingival margin, and the pocket depth. Data from six points

around the tooth were collected and bleeding with probing was determined. The presence of biofilm was determined with the O'Leary index (O'Leary et al., 1972). Patients were considered periodontally healthy if they did not bleed while probing and had a pocket depth of less than 3 mm.

The demographic data of the participants were recorded in the medical history, including age, sex, and medical records. The participants were assigned to one of four groups according to the severity of their OSA and their periodontal diagnosis, as follows: Group 1 (H), healthy patients: non-periodontitis and non-OSA ($n = 25$); Group 2 (P), periodontitis and non-OSA patients ($n = 17$); Group 3 (OSA), OSA and non-periodontitis patients ($n = 19$); and Group 4 (P-OSA), periodontitis and OSA patients ($n = 32$).

Oral sample collection

There was no periodontal stimulus performed prior to the collection of the samples (probing, prophylaxis, and calculus removal). Three samples (saliva, subgingival plaque, and gingival sulcus) were taken from the oral cavity of patients. First, they were asked to simply spit into polypropylene tubes containing thioglycolate medium (Oxoid®) to collect approximately 1 ml of unstimulated saliva (Nizam et al., 2014). Immediately, the gingival sulcus sample was collected, performing a relative isolation of the area of the tooth of interest with gauze and cotton rolls, and constant drying with cotton swabs to eliminate saliva contamination. In healthy patients, the gingival sulcus sample collection was any area without bleeding, while in patients with periodontitis, this sample was at a site diagnosed with periodontitis. This sample was taken by inserting standardized absorbent papers (Periopapers, Oral Flow®, Plainview, NY), approximately 3 mm for 30 s into the periodontal sulcus, which were then put into PBS to elute the Periopaper content by vortexing for 10 s and subsequently transferred to polypropylene tubes containing thioglycolate medium (Gamsiz-Isik et al., 2017). The supragingival plaque was removed with a sterile curette and gauze before obtaining the subgingival plaque sample, which was collected with a curette and introduced into polypropylene tubes containing thioglycolate medium (Nizam et al., 2016). The samples were stored at 4°C during transportation until arrival at the laboratory to be processed.

Microbial identification by MALDI-TOF-MS

All oral samples were centrifuged at 4,000 $\times g$ for 20 min and the pellet was resuspended in 1 ml of thioglycolate medium. A suspension aliquot was cultivated in BBL Columbia Agar™ with 5% sheep blood and another one in Sabouraud agar (Merck®),

and incubated at 37°C for 2 and 7 days in anaerobiosis and aerobiosis conditions, respectively. At the end of the incubation time, each type of microbial colony was characterized macroscopically and microscopically and identified by mass spectrometry with MALDI-TOF MS, using the MALDI Biotyper® system (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA). For this procedure, the direct method for extracting proteins from microorganisms in plaque was performed applying a small amount of colony on a plaque of the MALDI in duplicate, allowing it to dry at room temperature. Subsequently, 1 μ l of formic acid was added to the colonies allowed to dry and then 1 μ l of the matrix solution (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) was added to extract proteins, mainly ribosomal ones present in high concentrations, and again allowed to dry at room temperature. Once this procedure was performed, the mass spectra were acquired using MALDI-TOF-MS equipment (Microflex from® Burker Daltonik Inc). The mass spectra were analyzed within a range of 2,000 to 20,000 m/z . The MALDI Biotyper version 3.0 library and the MALDI Biotyper version 3.1 software were used for identification considering the cutoff scores ≥ 1.5 for the genus level and ≥ 1.7 for the species level. Finally, once the colonies were identified, they were stored at -70°C in thioglycolate medium with 20% glycerol for further studies.

Statistical analysis

The first part of this research consisted in the characterization and level of the microbiota for each group. Then, the relative abundances of microorganisms were quantified according to Socransky's microbial complexes (Socransky et al., 1998), adding three categories: yeasts (*Candida* spp.), microorganisms of the oral cavity not classified in the complexes (*Lactobacillus* spp.), and other microorganisms neither classified in the complexes nor associated with specific pathologies in the oral cavity (*Staphylococcus* spp., *Rothia* spp., *Cutibacterium* spp., and *Atopobium* spp.). In the second part, tests were carried out to compare the relative abundance of each category of microorganisms for each type of sample (saliva, subgingival plaque, and gingival sulcus) within each group of patients. The comparison of the relative abundances of microorganisms among the different groups of patients was carried out (p -value < 0.5). Finally, association tests were performed within each group using the Spearman r test (p -value < 0.5) and a multidimensional grouping analysis according to the abundance of microorganisms common among the groups of patients. The tests GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software, California, USA), the free software R 4.01 license GPNU (Free Software Foundation, Boston, USA), and XLSTAT statistical and data analysis solution (Addinsoft, New York, USA) were used.

Results

The demographic data, medical history and periodontal parameters of the patients are presented in Table 1. The ratio of women to men was high in all groups, except in the Group 4 (P-OSA), where there was a higher percentage of men. The periodontal clinical parameters showed statistically significant differences between Group 1 (H) and the other groups of patients ($p < 0.05$) in relation to the percentage of teeth with periodontitis and the percentage of biofilm (Table 1).

Regarding the periodontal condition, it was evidenced that 56% of patients in Group 1 (H) had biofilm-induced gingivitis in a reduced periodontium vs. clinical gingival health on an intact periodontium ($p = 0.000419$), followed by stable periodontal disease in a reduced periodontium with a 32% prevalence vs. clinical gingival health on an intact periodontium ($p = 0.03248$). These conditions are considered in healthy patients according to the latest classification of periodontal diseases (Caton et al., 2018). In Group 2 (P), 65% of patients presented stage III periodontitis vs. stage I periodontitis ($p = 0.0012$). In Group 3 (OSA), 79% of patients presented biofilm-induced gingivitis in a reduced periodontium vs. Group 1 ($p = 0.024$). In Group 4 (P-OSA), 81% of the patients presented stage III periodontitis vs. Groups 1 and 3 ($p < 0.0001$). Regarding the diagnosis of OSA according to the degree of severity in Group 3 (OSA), 63% of patients presented mild OSA (mild OSA vs. moderate OSA: $p = 0.006$; mild OSA vs. severe OSA: $p = 0.023$), 16% presented moderate OSA and 21% presented severe OSA, with mild OSA being the most prevalent. However, in Group 4 (P-OSA), 19% of patients had mild OSA, 31% had moderate OSA, and 50% had

severe OSA ($p = 0.02$), showing statistically significant differences between Group 3 (OSA) and Group 4 (P-OSA) ($p = 0.04$) (Table 2).

Similarly, when the link between OSA and periodontitis was investigated, it was found that 35% of individuals with periodontitis had mild OSA, 71% had moderate OSA, and 80% had severe OSA. Although the association between OSA and periodontitis did not show statistically significant difference ($p = 0.2813$), the stage III periodontitis was statistically significant with severe OSA ($p = 0.0157$) (Table 3).

Distribution of complexes and categories of microorganisms

A general descriptive analysis of all groups showed that the relative frequency in the presence of the microorganisms for the purple complex, the categories of *Candida* spp., *Lactobacillus* spp., and others, was higher in saliva and the relative frequency of the other complexes was higher in subgingival plaque (Table 4).

The percentages of microorganisms for each complex and category were adjusted to percentages of relative frequency according to the total number of microorganisms identified by complex and category in each group of patients and the total number of microorganisms identified by each group. In this way, the microbial composition inter- and intra-group of patients was analyzed. According to the inter-group analysis (Figure 1, bar graph) there is a greater number of microorganisms distributed in all complexes and categories in Group 4 (P-OSA), highlighting the greater presence of microorganisms of the

TABLE 1 Demographic data and clinical characteristics of the groups of patients.

	Group 1 (H) (<i>n</i> = 25)	Group 2(P) (<i>n</i> = 17)	Group 3 (OSA) (<i>n</i> = 19)	Group 4(P-OSA) (<i>n</i> = 32)
<i>Demographic parameters</i>				
Age (years), mean (SD)	46 (14)	41 (10)	50 (13)	49 (11)
Sex (female) (%)	80	76	63	34
Sex (male) (%)	20	24	37	66
<i>Systemic conditions</i>				
HTN (%)	12	18	42	19
HLD (%)	8	6	11	3
HT (%)	8	18	11	19
<i>Clinical parameters</i>				
Teeth present, mean (SD)	26.0 (3.92)	26.8 (2.22)	23.89 (6.29)	25.22 (5.59)
Missing teeth, mean (SD)	5.96 (3.92)	5.23 (2.22)	8.1 (6.29)	6.78 (5.62)
Percentage of teeth with periodontitis, mean (SD)	1.94 (3.57)	43.83 (24) *	1.62 (3.15)	38.48 (21.25) *
Presence of caries (%)	12	18	5	31
Percentage of biofilm, mean (SD)	23 (16)	45.2 (25.95) **	38.6 (20.63) **	40.6 (18.7) **

Group 1 (H) healthy patients, non-periodontitis, and non-OSA; Group 2 (P) periodontitis and non-OSA patients; Group 3 (OSA) OSA and non-periodontitis patients; Group 4 (P-OSA) periodontitis and OSA patients. SD, standard deviation. HTN, arterial hypertension; HLD, hyperlipidemia; HT, hypothyroidism. Significant differences, G1 (S) vs. G2 (P) $p \leq 0.0001$; G1 (S) vs. G4 (PA) $p \leq 0.0001$; G1 (S) vs. G2 (P) $p = 0.0014$; G1 (S) vs. G3 (P) $p = 0.0072$; G1 (S) vs. G4 (P) $p = 0.0004$. Multiple t-test (multiple comparisons using the Bonferroni-Dunn method).

TABLE 2 Percentage of patients of each group according to periodontal condition and degree of OSA.

	Group 1 (H) (n = 25)	Group 2 (P) (n = 17)	Group 3 (OSA) (n = 19)	Group 4 (P-OSA) (n = 32)	p-value*	p-value [†]
	Percentage (%)					
Periodontal condition						
Clinical gingival health on an intact periodontium	4	0	5	0	ns	ns
Biofilm-induced gingivitis	8	0	0	0	ns	ns
Biofilm-induced gingivitis in a reduced periodontium	56*	0	79‡	0	0.000419	0.024
Stable periodontal disease in reduced periodontium	32*	0	16	0	0.03248	ns
Periodontitis Stage I	0	6	0	0	ns	ns
Periodontitis Stage II	0	24	0	16	ns	ns
Periodontitis Stage III	0	65*	0	81‡	0.0012	0.0001
Periodontitis Stage IV	0	6	0	3	ns	ns
Degree of OSA						
Mild OSA	0	0	63*‡	19	0.006	0.023
Moderate OSA	0	0	16	31	ns	ns
Severe AOS	0	0	21	50*‡	0.02	0.04

Group 1 (H): p-value* of Clinical gingival health on an intact periodontium vs. Biofilm-induced gingivitis in a reduced periodontium and Clinical gingival health on an intact periodontium vs. Stable periodontal disease in reduced periodontium, Group 2 (P): p-value* of Periodontitis Stage I vs. Periodontitis Stage III, Group 3 (OSA): p-value* of Mild OSA vs. Moderate OSA; p-value† of Mild OSA vs. Severe AOS, and Clinical gingival health on an intact periodontium vs. Biofilm-induced gingivitis in a reduced periodontium, Group 4 (P-OSA): p-value* of Mild OSA vs. Severe AOS; p-value‡ of Moderate OSA vs. Severe AOS, and Periodontitis Stage I vs. Periodontitis Stage III.

TABLE 3 Frequency and percentage of the periodontal condition according to apnea diagnosis.

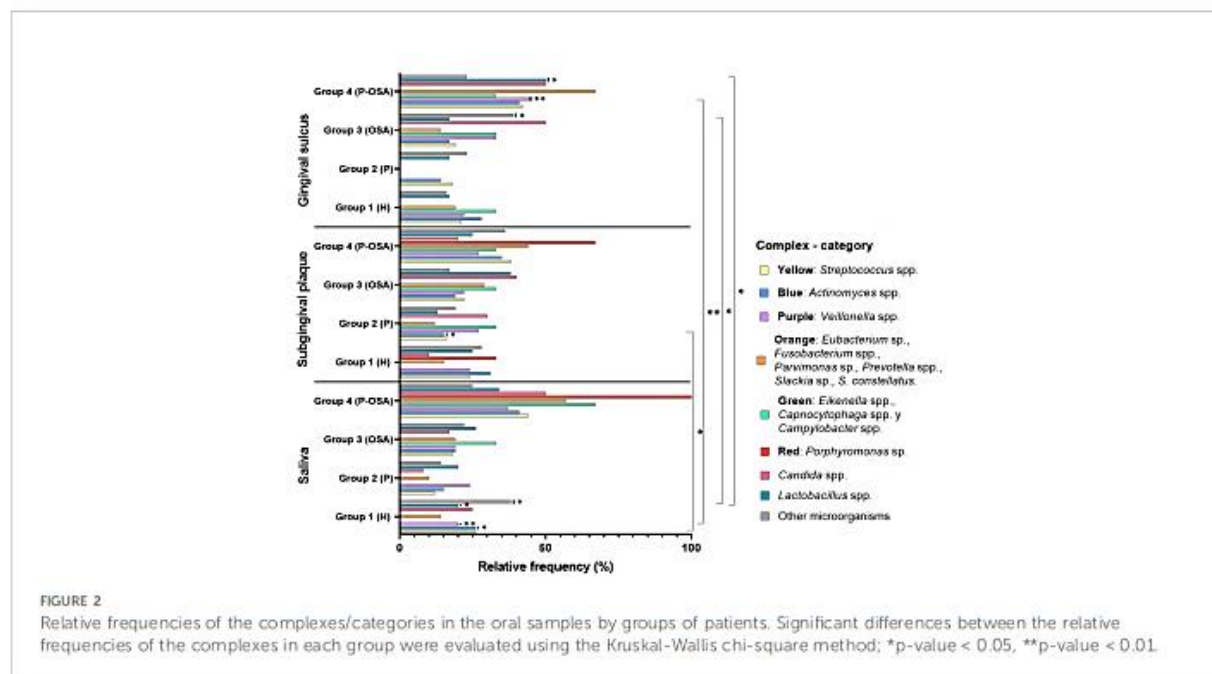
Periodontal diagnosis	OSA Diagnosis								p-value
	Non-OSA		Mild OSA		Moderate OSA		Severe OSA		
	Fr	%	Fr	%	Fr	%	Fr	%	
Non-periodontitis	25	60	11	65	4	29	4	20	0.2813
Stage I Periodontitis (Mild)	1	2	0	0	0	0	0	0	0.0157
Stage II Periodontitis (Moderate)	3	7	1	6	3	21	1	5	
Stage III Periodontitis (Severe)	12	29	5	29	6	43	15	75	
Stage IV Periodontitis (Advanced)	1	2	0	0	1	7	0	0	
Total	42	100	17	100	14	100	20	100	

Fr: Frequency, %: Percentage; two-way ANOVA, p < 0.05.

TABLE 4 Relative frequencies of the distribution of complexes and categories by samples in the groups of patients.

	Yellow complex	Blue complex	Purple complex	Green complex	Orange complex	Red complex	Candida spp.	Lactobacillus spp.	Other
Saliva	0.32	0.14	0.54	0.17	0.28	0.25	0.50	0.71	0.54
Subgingival plaque	0.44	0.50	0.37	0.50	0.45	0.75	0.42	0.16	0.28
Gingival sulcus	0.24	0.36	0.09	0.33	0.28	0.00	0.08	0.12	0.18

The bold values means Kruskal-Wallis chi-squared p-value < 0.05.



the blue and green complexes are correlated with the percentage of biofilm ($r_s = 0.54$ and 0.37 , respectively), in contrast to *Lactobacillus* spp. and the percentage of the biofilm, which showed a negative correlation ($r_s = -0.44$). Also, there was a positive correlation between the yellow complex and the blue complex ($r_s = 0.43$) and a negative correlation between the yellow complex and the red complex, with slight statistical significance ($r_s = -0.33$) (Figure 3A).

In Group 2 (P), there was a positive correlation with statistical significance between age and the presence of caries as with the percentage of biofilm ($r_s = 0.51$ and 0.45 , respectively). In turn, the percentage of biofilm is positively correlated with hypertension, hypothyroidism, and the presence of calculus ($r_s = 0.54$, 0.50 , and 0.59 respectively). Also, the presence of *Candida* spp. was positively correlated with the presence of caries ($r_s = 0.62$) and the yellow complex ($r_s = 0.50$). Even though the percentage of teeth with periodontitis, the stage of periodontitis, and the presence of calculus were negatively correlated with the orange complex ($r_s = -0.43$, -0.52 , and -0.50 , respectively), they were positively correlated with the green complex and other microorganisms, which likewise presented a positive correlation between them ($r_s = 0.65$). In addition, there was a positive correlation between the number of teeth absent and the presence of other microorganisms ($r_s = 0.43$). Other microorganisms have a negative correlation with the presence of *Candida* spp. and the yellow complex ($r_s = -0.49$ and -0.59 , respectively) (Figure 3B).

In Group 3 (OSA), the age of the patients had a positive statistically significant correlation with hypertension and the degree of severity of OSA ($r_s = 0.48$ and 0.45 , respectively). In addition,

HTN was positively correlated with severity of OSA ($r_s = 0.64$), the yellow complex ($r_s = 0.38$), and the blue complex ($r_s = 0.40$). When analyzing the percentage of teeth with periodontitis, it was possible to identify a positive correlation with the presence of caries ($r_s = 0.50$), the severity of OSA ($r_s = 0.43$), and the presence of *Candida* spp. ($r_s = 0.55$). The presence of caries and number of decayed teeth were positively correlated with the percentage of biofilm ($r_s = 0.39$); the yellow ($r_s = 0.39$), blue ($r_s = 0.40$), and green ($r_s = 0.51$) complexes; and *Candida* spp. ($r_s = 0.48$). In turn, the percentage of biofilm correlated positively with the presence of the yellow and blue complexes ($r_s = 0.56$ and 0.40 , respectively). The blue complex was correlated positively with the presence of calculus and the severity of OSA ($r_s = 0.45$ and 0.48 , respectively). When analyzing the relationship between the presence of the complexes, it was evidenced that the yellow complex is positively correlated with *Candida* spp. with a slight statistical significance ($r_s = 0.38$). A similar correlation was given between the blue and the green complexes ($r_s = 0.38$), which had a positive correlation with the orange complex ($r_s = 0.50$). The latter complex was positively correlated with the purple complex ($r_s = 0.55$), and *Candida* spp. and *Lactobacillus* spp. presented a positive correlation ($r_s = 0.41$). Other microorganisms presented a negative correlation with the presence of the yellow complex ($r_s = -0.43$), purple complex ($r_s = -0.52$), and *Lactobacillus* spp. ($r_s = -0.58$) (Figure 3C).

In Group 4 (P-OSA), the age of the patients was correlated positively with the HTN ($r_s = 0.41$), absence of teeth ($v = 0.70$), the orange complex ($r_s = 0.41$), and the red complex ($r_s = 0.32$). Similarly, it was found that HTN has a positive correlation with HLD ($r_s = 0.37$) and the severity of OSA ($r_s = 0.48$). The lack of teeth in patients with periodontitis and OSA has been shown to be

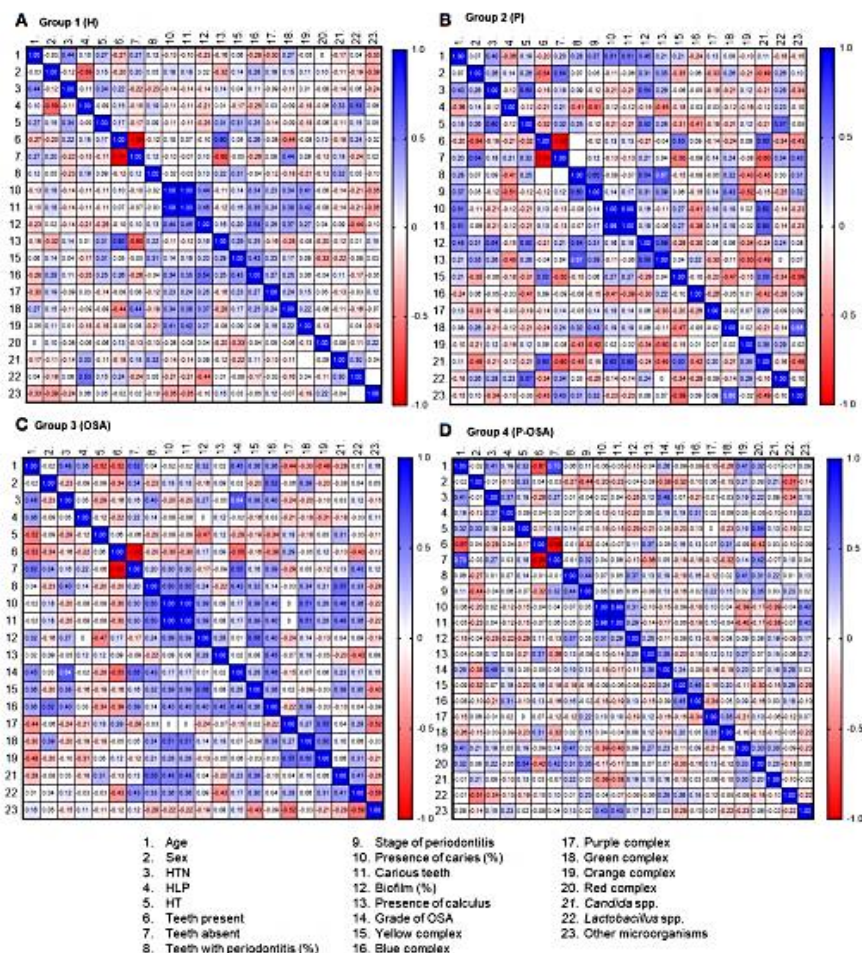
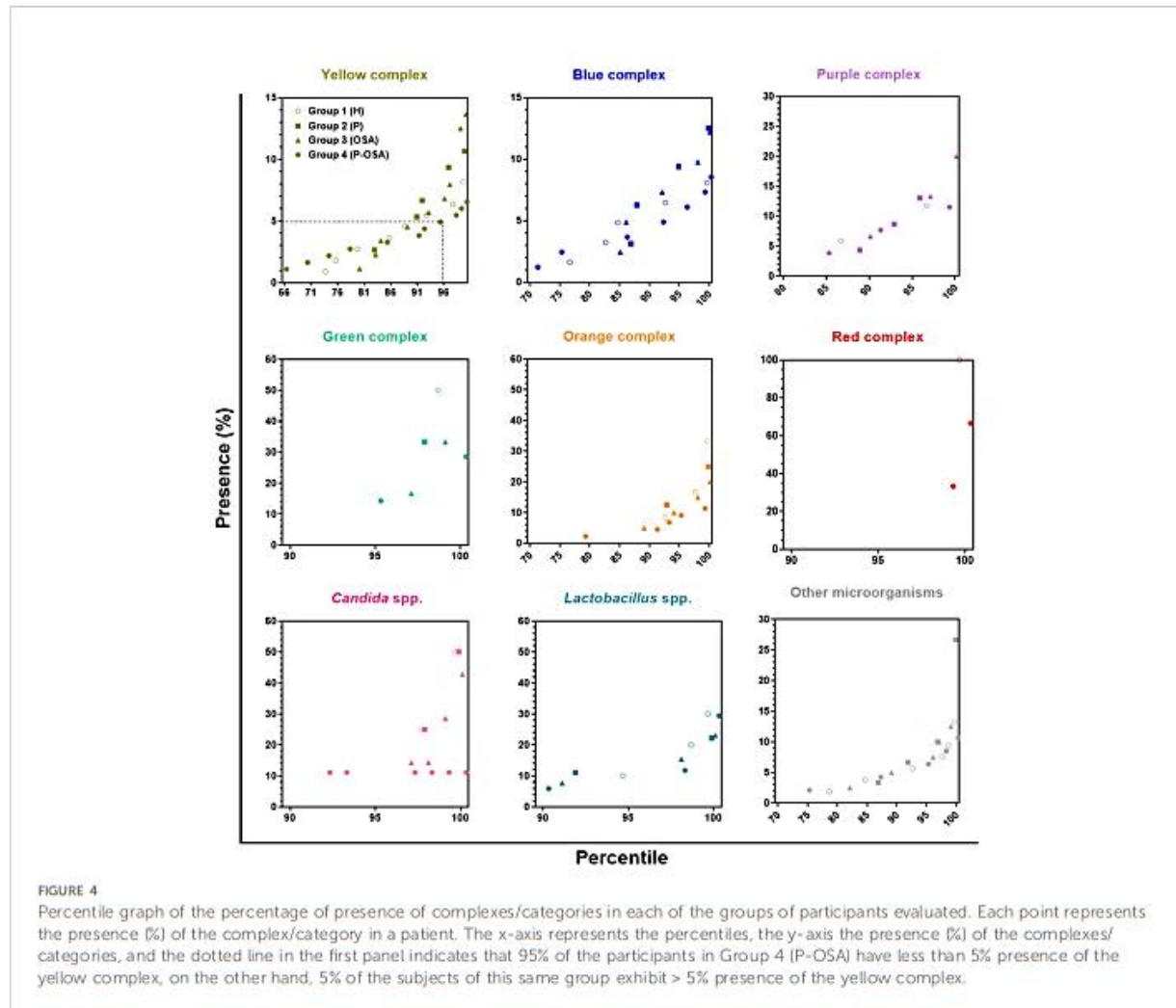


FIGURE 3
Multicomponent matrix for the correlation of clinical factors and complex/categories of microorganisms present in each of the groups of patients evaluated: (A) Group 1 (H), n = 25; (B) Group 2 (P), n = 17; (C) Group 3 (OSA), n = 19; (D) Group 4 (P-OSA), n = 32, using the Spearman's rank correlation coefficient $r_s > 0.30$, $p < 0.05$. The blue tones represent a positive correlation and the red tones represent a negative correlation. HTN, arterial hypertension. HLD, hyperlipidemia. HT: hypothyroidism.

strongly connected with periodontitis stage ($r_s = 0.32$) and the presence of red complex bacteria ($r_s = 0.42$). On the other hand, the percentage of teeth with periodontitis was correlated with the percentage of biofilm ($r_s = 0.37$), the presence of the orange complex ($r_s = 0.41$), and slightly with the red complex ($r_s = 0.31$). In this group of patients, the presence of calculus was positively correlated with the severity of OSA ($r_s = 0.39$) and the stage of periodontitis was positively correlated with the presence of the red complex ($r_s = 0.35$). About the correlation of the presence of the complexes, there was a positive correlation between the yellow and blue complexes ($r_s = 0.45$), the purple and green complexes ($r_s = 0.35$), the orange and red complexes ($r_s = 0.33$), and the orange complex with *Candida* spp. ($r_s = 0.30$) (Figure 3D).

Prevalence of complexes and categories

Figure 4 presents the percentile plots that indicate the prevalence of the complexes and categories in each group of patients evaluated. This figure indicates that the yellow complex was detected in 27% of the patients of Group 1 (H), who harbored up to 8% of the microorganisms of this complex. In Group 2 (P), it was detected in 18% of the patients, who harbored up to 11% of the microorganisms of this complex. In Group 3 (OSA), it was detected in 21% of the patients, who presented up to 14% of the microorganisms of the complex. In Group 4 (P-OSA), it was detected in 35% of the patients, who presented up to 7% of the microorganisms of the yellow



complex. The blue complex was detected in 24% of the patients of Group 1 (H), 14% of the patients of Group 2 (P), 16% of the patients of Group 3 (OSA), and 30% of the patients of Group 4 (P-OSA), who presented up to 8%, 13%, 12%, and 9% of the microorganisms of this complex, respectively. The purple complex was detected in 14%, 12%, 11%, and 16% of the patients of Group 1 (H), Group 2 (P), Group 3 (OSA), and Group 4 (P-OSA), respectively, who presented respectively up to 12%, 13%, 20%, and 11% of the microorganisms of this complex. The green complex was detected in 2%, 3%, 4%, and 6% of the patients of Group 1 (H), Group 2 (P), Group 3 (OSA), and Group 4 (P-OSA), respectively, who presented up to 50%, 33%, 33%, and 29% of the microorganisms of this complex, respectively. The orange complex was detected in 8% of the patients of Group 1 (H) and Group 2 (P), and in 12% and 28% of the patients of Group 3 (OSA) and Group 4 (P-OSA) respectively, who presented up to 33%, 25%, 20%, and 11% of the microorganisms of this complex, respectively. The red

complex was detected in 1% of Group 1 (H) and 2% of Group 4 (P-OSA) patients. The category *Candida* spp. was detected in 3% of the patients of Group 1 (H) and Group 2 (P), which housed up to 50% of the yeasts of this category, and on the other hand, this category was detected in 4% of the patients of Group 3 (OSA) and 9% of the patients of Group 4 (P-OSA), which presented up to 42% and 11% of the yeasts of this category, respectively. The category *Lactobacillus* spp. was detected in 6%, 9%, 10%, and 11% of the patients of Group 1 (H), Group 2 (P), Group 3 (OSA), and Group 4 (P-OSA), respectively, who housed up to 30%, 22%, 23%, and 29% of *Lactobacillus* spp., correspondingly. Finally, the category other microorganisms was detected in 22%, 14%, 19%, and 26% of the patients of Group 1 (H), Group 2 (P), Group 3 (OSA), and Group 4 (P-OSA), who presented up to 13%, 27%, 12.5%, and 10.6% of the microorganisms in this category, respectively (Figure 4). All complexes and categories of *Candida* spp., *Lactobacillus* spp., and other microorganisms were more prevalent in Group 4

(P-OSA); however, no statistically significant differences were found.

Multidimensional scaling analysis

To show the differences between the consortia of the most common microorganisms present in each group of patients, we performed a multidimensional scaling (MDS) analysis. This analysis was established according to the dissimilarity (distance matrix) of the microorganisms present in each consortium, through the stress adjustment measure that is based on the differences between the predicted and actual distances and visualized in 3D plots (Figure 5). Six clusters formed the consortiums of microorganisms in both the group of healthy patients (Group 1) and the group of patients with periodontitis (Group 2), which showed the greatest intra-group dissimilarity (Kruskal stress = 0.188 and 0.198, respectively); on the other hand, two clusters formed the consortium of microorganisms in patients with OSA (Group 3) and six clusters formed the consortium of microorganisms in patients with periodontitis and with OSA

(Group 4), which showed the smallest intra-group dissimilarity (Kruskal stress = 0.009 and 0.094, respectively).

In Group 3, dimension 3 was defined by *Streptococcus anginosus* (yellow complex) and dimensions 1 and 2 were composed of the rest of the common microorganisms; this means that the presence of *S. anginosus* could be a distinctive marker within the patients of this group, in terms of the most common microorganism found. On the other hand, in Group 4, another microorganism was found as the most common or distinctive marker: *Capnocytophaga ochracea* (green complex), which defined dimension 3 but with a negative modulation, while the positive axis of dimensions 1 and 2 was differentiated by *Actinomyces georgiae* (blue complex), *Prevotella melaninogenica* (orange complex), and *C. albicans*, the three of them forming a cluster, and *Lactobacillus paracasei* predominated in the positive axis of dimension 3.

Discussion

This is the first report regarding the characterization of the oral microbiota in patients with periodontitis associated with

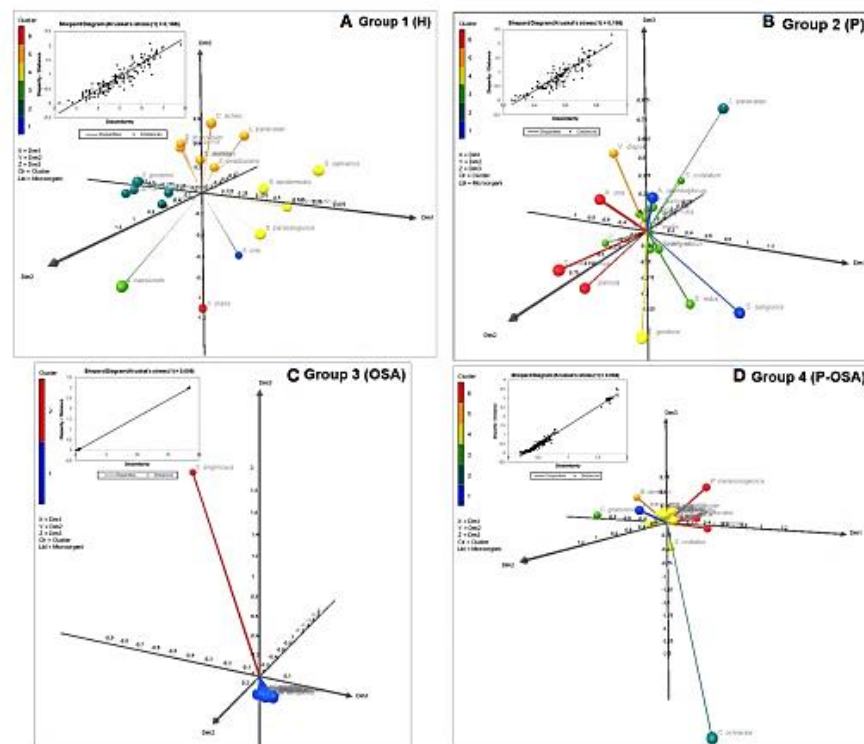


FIGURE 5
Multidimensional Scaling (MDS) based on Proximity Matrices (Euclidean Distance) and Kruskal Stress for the three-dimensional visualization (XLSTAT3DPlot) of the consortia made up of the most common microorganisms by group of patients: (A) Group 1 (H); (B) Group 2 (P); (C) Group 3 (OSA); (D) Group 4 (P-OSA).

OSA using MALDI-TOF MS as a tool for rapid identification of oral microorganisms. Additionally, the differences in the oral microbiota between individuals with and without periodontitis, and with and without OSA had not been reported before. The present study showed that there are more cases of stage III periodontitis in patients with severe OSA. Our results are similar to the findings reported by Gamsiz-Isik et al. (2017) and support the hypothesis that there is a higher prevalence of periodontitis in patients with OSA (Gunaratnam et al., 2009; Ahmad et al., 2013; Seo et al., 2013; Cuervo et al., 2016; Gamsiz-Isik et al., 2017; Latorre et al., 2018).

When determining the periodontal parameters of the patients evaluated in this study, a higher percentage of biofilm in patients with periodontitis, with OSA, and with both conditions was detected in opposition to healthy patients ($p < 0.01$). This finding is consistent with the significant relationship between the presence of OSA and the percentage of biofilm reported by Loke et al. (2015) and by Gamsiz-Isik et al. (2017). The evidence suggests that the colonization of a dysbiotic microbiota favored by oral dryness increases CO₂ levels and decreased O₂, and those three are the main factors involved in the pathophysiology of OSA (Nizam et al., 2016), which, in turn, affects bone remodeling in patients with periodontitis.

In the present study, a characterization of the microbiota established in patients with OSA and periodontitis was carried out. It was possible to determine the highest relative frequencies of all of the Socransky's complexes in the subgingival plaque, except the purple one, while the purple complex, *Candida* spp., *Lactobacillus* spp., and other microorganisms presented the highest relative frequencies in saliva. Although it was evidenced that the complexes and categories of microorganisms are present in all the groups evaluated, a greater microbial diversity was demonstrated in the patients with both conditions (OSA and periodontitis). All groups showed different percentages of microorganisms according to the sample evaluated (saliva, subgingival plaque, or gingival sulcus), raising a possible "modulation" of the microorganisms depending on the state of health or disease (Socransky and Haffajee, 2005; Curtis et al., 2020).

The use of the MALDI-TOF MS, which only identifies cultivable microorganisms, was one of the study's limitations. This method might have an impact on the findings and might have omitted the presence of other microorganism species. Additionally, these findings should be validated in further studies with a bigger sample and in other populations.

Despite the limitations in having carried out microbial identification by MALDI-TOF MS, it is important to highlight that our results are comparable to those of prior studies and support the hypothesis that OSA influences the colonization of a potentially infectious dysbiotic microbiota in the oral cavity, as other authors have proposed. Nizam et al. (2016) determined a marked increase in Gram-negative bacteria in dental plaque samples in patients with severe OSA and periodontal disease and

also reported Gram-positive bacteria in dental plaque in severe cases of OSA (Nizam et al., 2016), whereas Chen et al. (2021) determined that well-known periodontal pathogen species do not significantly increase their relative abundance in patients with OSA; however, the salivary microbial community structure was altered, affecting the interactions of different bacteria in the pathogenesis process of periodontitis in patients with OSA, along with an increase of *Prevotella* spp. In the present study, we identified the most common microorganisms in patients with both periodontitis and OSA (P-OSA), highlighting the presence of *A. georgiae*, *P. melaninogenica*, *L. paracasei*, and *C. albicans*, as potential distinctive markers for both diseases. These results might explain the presence of periodontitis in patients with OSA.

Concerning the association of clinical factors and the oral microbiota characterized in each group of patients, the relationship between the percentage of biofilm and other oral pathologies such as caries was evidenced, given the presence of microorganisms mainly of the yellow and blue complexes in healthy patients. This finding is consistent with previous reports in the literature (Colombo and Tanner, 2019; Valm, 2019). Despite not fulfilling all the parameters to be classified into the group of periodontitis according to the new classification adopted since 2018 (Caton et al., 2018), the presence of teeth with periodontitis was detected in these patients, and it was related to the bacteria of the yellow complex and *Candida* spp. These data are relevant considering that different authors have reported the colonization of yeasts of the genus *Candida*, especially *C. albicans*, in periodontal pockets of patients with severe chronic periodontitis (Canabarro et al., 2013), and the prevalence of these species was 50% and 60% in patients with aggressive and chronic periodontitis, respectively (Vieira Colombo et al., 2016). These previous results suggest that *C. albicans* plays a role in the progression of conditions such as periodontitis, given its known pathogenic power to invade oral epithelial tissue, form hyphae, secrete proteinases, and interact with commensal streptococci to synergistically promote their virulence (Martin et al., 2011; Xu et al., 2014; Belibasakis et al., 2015; Charalampakis and Belibasakis, 2015; Chevalier et al., 2017; Mombelli, 2018).

In recent decades, there has been an increase in reports demonstrating the bidirectional risk between periodontitis and systemic diseases such as hypertension (Latorre et al., 2018), CVDs (Bui et al., 2019), hypothyroidism, metabolic syndromes (Jaramillo et al., 2017), and diabetes (Zhou et al., 2013; Escobar et al., 2014; Genco and Borgnakke, 2020). In older patients, this risk was confirmed by the correlation of the percentage of biofilm detected in patients of Group 2 (P) with age of patients ($r_s = 0.45$, $p = 0.035$), and with diseases such as hypertension ($r_s = 0.54$, $p = 0.0162$) and hypothyroidism ($r_s = 0.50$, $p = 0.0023$). Additionally, the cases of caries present in this group of subjects were associated with the presence of *Candida* spp. and, in turn, with the bacteria of the yellow complex, contributing to the hypothesis that yeasts of the

genus *Candida* can behave as a primary colonizer in dysbiotic biofilms (Janus et al., 2017). The percentage of teeth with periodontitis was associated with the percentage of biofilm and the presence of calculus. These results confirm that the formation of polymicrobial consortia is one of the main factors contributing to the risk of periodontitis. In Group 2 (P), periodontitis was mainly associated with the presence of green complex bacteria, recognized in mature pathogenic biofilms where environments with low oxygen concentrations are produced (Haffajee et al., 2008). Therefore, these findings support the role of these bacteria as indicators of ecological changes in the subgingival biofilm during the progression of periodontitis (Henne et al., 2014). Likewise, the category of "other microorganisms", in which those that are not usually identified as oral pathogens were grouped, was also associated with periodontitis. These results confirm the prevalence of other potentially pathogenic species of clinical relevance in the oral cavity as was evidenced by Vieira Colombo et al. (2016) who showed the microbiota of the subgingival plaque of individuals with different states of periodontitis, highlighting the presence of bacteria of the genera *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, and *Enterobacteria*, among others (Vieira Colombo et al., 2016).

OSA is a risk factor for CVDs, as it increases morbidity and mortality in patients with arterial hypertension (HTN), coronary heart disease, atrial fibrillation, and heart failure (Zhou et al., 2013; Genco and Borgnakke, 2020). The results of our study showed that the severity of OSA in Group 3 was associated with hypertension and with the percentage of teeth with periodontitis. Thus, it is necessary to emphasize that the presence of teeth with periodontitis in this group is correlated with the severity of OSA, caries, and the presence of *Candida* spp., establishing a possible association between the infectious processes in the periodontium and the presence of microorganisms such as *Candida* spp. that are different from the usual periodontopathogens.

The cause-effect relationship between periodontitis and OSA, however, is not fully understood. Several mechanisms have been proposed, involving genetic, immunological, and microbiological factors (Nizam et al., 2014; Al-Jewair et al., 2015). Our findings suggest that there is an association between risk factors such as HTN, HLD, and HT and patient age, which supports the previously reported bidirectional relationship of both diseases (Gunaratnam et al., 2009; Keller et al., 2013; Seo et al., 2013; Sanders et al., 2015; Cuervo et al., 2016; Latorre et al., 2018). Additionally, it was evident that the bacteria of the orange complex participate in this association, together with the red complex, which, in turn, was associated with the loss of teeth and the stage of periodontitis. In the same way, both complexes were associated with the formation of the dysbiotic biofilm (Lamont and Hajishengallis, 2015). While it is true that the presence of bacteria considered periodontopathogenic was

associated with the presence of periodontitis in patients with OSA, it is important to note that the presence of *Candida* spp. was more prevalent in patients with periodontitis, and in addition, these yeasts were mainly associated with the bacteria of the orange complex. Then, we propose a new hypothesis: in the presence of both diseases, these opportunistic microorganisms may have a behavior that allows the colonization of periodontopathogenic bacteria. It has been demonstrated through *in vitro* studies that yeasts such as *C. albicans* modulate the microenvironment, causing anoxic conditions, favoring the growth of strictly anaerobic bacteria, and synergistically promoting the formation of dysbiotic biofilms (Diaz et al., 2012; Fox et al., 2014; Sztukowska et al., 2018).

Even if OSA can favor the predisposing factors of periodontitis by the presence of *P. melaninogenica* and *C. albicans* increasing the severity of the periodontal disease, questions arise as to whether the inhibition of these microorganisms can control the pathogenicity of biofilm associated with the conditions evaluated. These findings suggest that antimicrobial strategies for treating periodontitis in patients with OSA can be tested *in vitro* using polymicrobial biofilms.

Conclusions

- *Men had a higher prevalence of stage III periodontitis and severe OSA.
- *There was a greater diversity of microorganisms in the oral samples evaluated from the patients with periodontitis and OSA, and the differences in the percentages of the presence of each complex and category were notorious.
- *The association between periodontitis and OSA was evidenced by sharing risk factors such as comorbidities and bacteria of the orange and red complexes associated with yeasts such as *Candida* spp.
- *Periodontal disease in patients showed positive and similar correlations among yellow, blue, orange, green, and purple bacteria complexes, *P. melaninogenica*, *C. albicans*, and the different oral microenvironments, indicating that the presence of *P. melaninogenica* and *C. albicans* should be considered in the prevention and treatment of this disease.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

This study was reviewed and approved by Comité de ética, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

MT-C, LO, and CP-G conceived and designed the study. MT-C and EH-D performed the statistical analysis. MT-C and HC-J performed the microbial identification. NA-J and DM-V conducted the periodontal examinations. CL-U and FE-A performed and supervised periodontal examinations. JV-P contributed to data analysis. PH-M practiced medical checks and the polysomnographic study. MT-C wrote the manuscript and prepared the tables and figures. MC, NR-M, LO, and CP-G reviewed and edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

Pontificia Universidad Javeriana-sede Bogotá financial support to the project “Characterization of the microbiota associated with obstructive sleep apnea in patients with periodontitis” (project number 008398).

Acknowledgments

We thank the Pontificia Universidad Javeriana-sede Bogotá for the financial support to the project “Characterization of the

microbiota associated with obstructive sleep apnea in patients with periodontitis” (project number 008144), and we greatly appreciate the support given by the Training Agreement for postgraduate studies of professors of the Pontificia Universidad Javeriana for their doctoral training. We also thank all the participants who were part of this project as patient donors of the oral samples.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.934298/full#supplementary-material>

References

- Ahmad N. E., Sanders A. E., Sheats R., Brame J. L., Essick G. K. (2013). Obstructive sleep apnea in association with periodontitis: a case-control study. *J. Dental Hygiene* 87 (4), 188–199.
- Al-Jewair T. S., Al-Jasser R., Almas K. (2015). Periodontitis and obstructive sleep apnea’s bidirectional relationship: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Breath* 19 (4), 1111–1120. doi: 10.1007/s11325-015-1160-8
- Antezack A., Chaudet H., Tissot-Dupont H., Brouqui P., Monnet-Corti V. (2020). Rapid diagnosis of periodontitis, a feasibility study using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One* 15 (3), 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0230334
- Arumugam M. (2015). A comparative evaluation of subgingival occurrence of candida species in chronic periodontitis and peri-implantitis: A clinical and microbiological study. *Int. J. Clin. Implant Dentis* 1 (December), 95–100. doi: 10.5005/jp-journals-10004-1041
- Barbenis C., Almuzara M., Join-Lambert O., Ramirez M. S., Famiglietti A., Vay C. (2014). Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of gram-positive rods. *PLoS One* 9 (9), 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0106303
- Belibasakis G., Charalampakis G., Bostanci N., Stadling B. (2015). “Peri-implant infections of oral biofilm etiology,” in *Biofilm-based healthcare-associated infections*. (Cham: Springer) 69–84.
- Bui F. Q., Almeida-da-Silva C. L. C., Huynh B., Trinh A., Liu J., Woodward J., et al. (2019). Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed. J.* 42 (1), 27–35. doi: 10.1016/j.bj.2018.12.001
- Cade B. E., Chen H., Stijp A. M., Gleason K. J., Sofer T., Ancoli-Israel S., et al. (2016). Genetic associations with obstructive sleep apnea traits in Hispanic/Latino americans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194 (7), 886–897. doi: 10.1164/rccm.201512-2431OC
- Canabarro A., Valle C., Farias M. R., Santos F. B., Lazera M., Wanke B. (2013). Association of subgingival colonization of candida albicans and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J. Periodontol. Res.* 48 (4), 428–432. doi: 10.1111/jre.12022
- Caton G., Armitage G., Berglundh T., Chapple I. L. C., Jepsen S., Komman S., et al. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.* 45 (March), S1–S8. doi: 10.1111/jcpe.12935
- Charalampakis G., Belibasakis G. N. (2015). Microbiome of peri-implant infections: Lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Vinence* 6 (3), 183–187. doi: 10.4161/21505594.2014.980661
- Chen Y., Chen X. C., Huang X., Duan Y., Gao H., Gao X., et al. (2021). Analysis of salivary microbiome and its association with periodontitis in patients with

- obstructive sleep apnea. *Front. Cell. Inf. Microbiol.* 11 (December), 1–17. doi: 10.3389/fcimb.2021.752475
- Chevalier M., Ranque S., Prêcheur I. (2017). Oral fungal-bacterial biofilm models *in vitro*: a review. *Med. Mycol.* 56 (6), 653–667. doi: 10.1093/mmy/myx111
- Colombo A. P. V., Tanner A. C. R. (2019). The role of bacterial biofilms in dental caries and periodontal and peri-implant diseases: A historical perspective. *J. Dental Res.* 98 (4), 373–385. doi: 10.1177/0022034519830686
- Cuervo A., Martínez M. C., Sosa G., Hernández M., Latorre C., Escobar F., et al. (2016). Condición periodontal de pacientes con apnea obstructiva del sueño. *Universitas Odontol.* 33 (June), 1–34. doi: 10.11144/averiana.uo35-74.cppa
- Curtis M. A., Diaz P. L., Van Dyke T. E. (2020). The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol.* 2000 83 (1), 14–25. doi: 10.1111/prd.12296
- Diaz P. L., Xie Z., Sobue T., Thompson A., Biyikoglu B., Ricker A., et al. (2012). Synergistic interaction between candida albicans and commensal oral streptococci in a novel *in vitro* mucosal model. *Infect. Immun.* 80 (2), 620–632. doi: 10.1128/IAI.05896-11
- Escobar F., Latorre C., Velosa J., Ferro M. B., Ruiz A., Arregoces F. E., et al. (2014). Relation between ultra-sensitive c-reactive protein, diabetes and periodontal disease in patients with and without myocardial infarction. *Arquivos Brasileiros Endocrinol. Metabol.* 58 (4), 362–368. doi: 10.1590/0004-2730000002899
- Fox E. P., Cowley E. S., Nobile C. J., Hartooni N., Newman D. K., Johnson A. D. (2014). Anaerobic bacteria grow within candida albicans biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Curr. Biol.* 24 (20), 2411–2416. doi: 10.1016/j.cub.2014.08.057
- Gamsiz-Isik H., Kiyan E., Bingol Z., Baser U., Ademoglu E., Yalcin F. (2017). Does obstructive sleep apnea increase the risk for periodontal disease? a case-control study. *J. Periodontol.* 88 (5), 443–449. doi: 10.1902/jop.2016.160365
- Genco R. J., Borgnakke W. S. (2020). Diabetes as a potential risk for periodontitis : association studies. *Periodontol.* 2000 83, 40–45. doi: 10.1111/prd.12270
- Genco R. J., Sanz M. (2020). Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases : An overview. *Periodontol.* 2000 83, 7–13. doi: 10.1111/prd.12344
- Gunaratnam K., Taylor B., Curtis B., Cistulli P. (2009). Obstructive sleep apnoea and periodontitis: a novel association? *Sleep Breathing* 13 (3), 233–239. doi: 10.1007/s11325-008-0244-0
- Haffajee A. D., Socransky S. S., Patel M. R., Song X. (2008). Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol.* 23 (3), 196–205. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x
- Hajishengallis G., Korostoff J. M. (2017). Revisiting the page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol.* 2000 75 (1), 116–151. doi: 10.1111/prd.12181
- Henne K., Fuchs F., Kruth S., Horz H. P., Conrads G. (2014). Shifts in campylobacter species abundance may reflect general microbial community shifts in periodontitis progression. *J. Oral Microbiol.* 6 (1), 6–11. doi: 10.3402/jom.v6.25874
- Hidalgo-Martínez P., Lobelo R. (2017). Epidemiología mundial, latinoamericana y colombiana y mortalidad del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS). *Rev. la Facultad Med.* 65 (1Sup), 17–20. doi: 10.15446/revfacmed.v65n1Sup.59565
- Janus M. M., Crieleard W., Volgenant C. M. C., der Veen M. H., Brandt B. W., Krom B. P. (2017). Candida albicans alters the bacterial microbiome of early *in vitro* oral biofilms. *J. Oral Microbiol.* 9 (1), 1–10. doi: 10.1080/20002297.2016.1270613
- Jaramillo A., Contreras A., Lafaurie G. L., Duque A., Ardila C. M., Duarte S., et al. (2017). Association of metabolic syndrome and chronic periodontitis in colombians. *Clin. Oral Investigations* 21 (5), 1537–1544. doi: 10.1007/s00784-016-1942-9
- Keller J. J., Wu C.-S., Chen Y.-H., Lin H.-C. (2013). Association between obstructive sleep apnoea and chronic periodontitis: a population-based study. *J. Clin. Periodontol.* 40 (2), 111–117. doi: 10.1111/jcpe.12036
- Lamont R. J., Hajishengallis G. (2015). "Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease," in *Trends in molecular medicine*. (Elsevier), 21, 172–183. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.004
- Lamont R. J., Koo H., Hajishengallis G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 745–759. doi: 10.1038/nrn.2018.4947/2017
- Latorre C., Escobar F., Velosa J., Rubiano D., Hidalgo-Martínez P., Otero L. (2018). Association between obstructive sleep apnea and comorbidities with periodontal disease in adults. *J. Indian Soc. Periodontol.* 22 (3), 215–220. doi: 10.4103/jisp.jisp_38_18
- Leombo D., Caroccia F., Lopes C., Moscajuri F., Sinjari B., D'Attilio M. (2021). Obstructive sleep apnea and periodontal disease: A systematic review. *Med. (Lithuania)* 57 (6), 1–12. doi: 10.3390/medicina57060640
- Loke W., Girvan T., Ingundson P., Verrett R., Schoolfield J., Mealey B. L. (2015). Investigating the association between obstructive sleep apnea and periodontitis. *J. Periodontol.* 86 (2), 232–243. doi: 10.1902/jop.2014.140229
- Martin R., Wächter B., Schaller M., Wilson D., Hube B. (2011). Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during candida albicans oral infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 301 (5), 417–422. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.04.009
- Mombelli A. (2018). Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol.* 2000 76 (1), 85–96. doi: 10.1111/prd.12147
- Nizam N., Basoglu O. K., Tasbakan M. S., Holtho A. (2014). Do salivary and serum collagenases have a role in an association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease ? a preliminary case – control study. *Arch. Oral Biol.* 60, 134–143. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.09.006
- Nizam N., Basoglu O. K., Tasbakan M. S., Nalbantsoy A., Buduneli N. (2014). Salivary cytokines and the association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease. *J. Periodontol.* 85 (7), e251–e258. doi: 10.1902/jop.2014.130579
- Nizam N., Tasbakan M. S., Basoglu O. K., Lappin D. F., Buduneli N. (2016). Is there an association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal inflammation? *Clin. Oral Investigations* 20 (4), 659–668. doi: 10.1007/s00784-015-1544-y
- O'Leary T. J., Drake R. B., Naylor J. E. (1972). The plaque control record. *J. Periodontol.* 43 (1), 38. doi: 10.1902/jop.1972.43.1.38
- Ruiz A., Rendón M., Hidalgo P., Cañón M., Otero L., Panqueva O., et al. (2016). Prevalence of sleep complaints in Colombia at different altitudes. *Sleep Sci.* 9 (2), 100–105. doi: 10.1016/j.SLSCI.2016.05.008
- Sanders A. E., Essick G. K., Beck J. D., Cai J., Beaver S., Finlayson T. L., et al. (2015). Periodontitis and sleep disordered breathing in the Hispanic community health Study/Study of Latinos. *Sleep* 38 (8), 1195–1203. doi: 10.5665/sleep.4890
- Sateia M. J. (2014). International classification of sleep disorders-third edition highlights and modifications. *CHEST* 146 (5), 1387–1394. doi: 10.1378/chest.14-0970
- Seo W. H., Cho E. R., Thomas R. J., An S. Y., Ryu J. J., Kim H., et al. (2013). The association between periodontitis and obstructive sleep apnea: A preliminary study. *J. Periodontol. Res.* 48 (4), 500–506. doi: 10.1111/jre.12032
- Socransky S. S., Haffajee A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol.* 2000 38 (1), 135–187. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x
- Socransky S. S., Haffajee A. D., Cugini M. A., Smith C., Kent R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25 (2), 134–144. doi: 10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x
- Sztukowska M. N., Dutton L. C., Delaney C., Ramsdale M., Ramage G., Jenkinson H. F., et al. (2018). Community development between porphyromonas gingivalis and candida albicans mediated by InlJ and Als3. *MBio* 9 (2), 1–16. doi: 10.1128/mBio.00202-18
- Tamai R., Sugamata M., Kiyoura Y. (2011). Candida albicans enhances invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by porphyromonas gingivalis. *Microbiol. Pathogen.* 51 (4), 250–254. doi: 10.1016/j.jmicpath.2011.06.009
- Valm A. M. (2019). The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J. Mol. Biol.* 431 (16), 2957–2969. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.016
- Vieira Colombo A. P., Magalhães C. B., Hartenbach F. A. R. R., Martins do Souto R., Maciel da Silva-Boghossian C. (2016). Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbiol. Pathogen.* 94, 27–34. doi: 10.1016/j.micpath.2015.09.009
- Xu H., Sobue T., Thompson A., Xie Z., Poon K., Ricker A., et al. (2014). Streptococcal co-infection augments candida pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell Microbiol.* 16 (2), 214–231. doi: 10.1111/cmi.12216
- Zhang X., Wang S., Xu H., Yi H., Guan J., Yin S. (2021). Metabolomics and microbiome profiling as biomarkers in obstructive sleep apnoea: A comprehensive review. *Eur. Respir. Rev.* 30 (160), 200220. doi: 10.1183/16000617.0220-2020
- Zhou M., Rong R., Munro D., Zhu C., Gao X., Zhang Q., et al. (2013). Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One* 8 (4), e61516. doi: 10.1371/journal.pone.0061516

4.1.1.2 Artículo 2



International Journal of
*Environmental Research
and Public Health*



Article

Cryptic Oral Microbiota: What Is Its Role as Obstructive Sleep Apnea-Related Periodontal Pathogens?

Mayra A. Téllez Corral ^{1,2,3,*}, Eddy Herrera Daza ⁴, Hayde K. Cuervo Jimenez ²,
María del Mar Bravo Becerra ², Jean Carlos Villamil ¹, Patricia Hidalgo Martínez ⁵,
Nelly S. Roa Molina ¹, Liliana Otero ¹, María E. Cortés ³ and Claudia M. Parra Giraldo ^{2,6,*}

- ¹ Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 110231, Colombia
 - ² Unidad de Investigación en Proteómica y Micosis Humanas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 110231, Colombia
 - ³ Faculty of Dentistry and Innovation Technology Graduate Program, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ⁴ Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 110231, Colombia
 - ⁵ Sleep Clinic, Hospital Universitario San Ignacio and Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 110231, Colombia
 - ⁶ Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
- * Correspondence: tellezm@javeriana.edu.co (M.A.T.C.); claudia.parra@javeriana.edu.co (C.M.P.G.)



Citation: Téllez Corral, M.A.; Herrera Daza, E.; Cuervo Jimenez, H.K.; Bravo Becerra, M.d.M.; Villamil, J.C.; Hidalgo Martínez, P.; Roa Molina, N.S.; Otero, L.; Cortés, M.E.; Parra Giraldo, C.M. Cryptic Oral Microbiota: What Is Its Role as Obstructive Sleep Apnea-Related Periodontal Pathogens? *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2023**, *20*, 1740. <https://doi.org/10.3390/ijerph20031740>

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 25 November 2022

Revised: 7 January 2023

Accepted: 12 January 2023

Published: 18 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Periodontitis has been commonly linked to periodontopathogens categorized in Socransky's microbial complexes; however, there is a lack of knowledge regarding "other microorganisms" or "cryptic microorganisms", which are rarely thought of as significant oral pathogens and have been neither previously categorized nor connected to illnesses in the oral cavity. This study hypothesized that these cryptic microorganisms could contribute to the modulation of oral microbiota present in health or disease (periodontitis and/or obstructive sleep apnea (OSA) patients). For this purpose, the presence and correlation among these cultivable cryptic oral microorganisms were identified, and their possible role in both conditions was determined. Data from oral samples of individuals with or without periodontitis and with or without OSA were obtained from a previous study. Demographic data, clinical oral characteristics, and genera and species of cultivable cryptic oral microorganisms identified by MALDI-TOF were recorded. The data from 75 participants were analyzed to determine the relative frequencies of cultivable cryptic microorganisms' genera and species, and microbial clusters and correlations tests were performed. According to periodontal condition, dental-biofilm-induced gingivitis in reduced periodontium and stage III periodontitis were found to have the highest diversity of cryptic microorganism species. Based on the experimental condition, these findings showed that there are genera related to disease conditions and others related to healthy conditions, with species that could be related to different chronic diseases being highlighted as periodontitis and OSA comorbidities. The cryptic microorganisms within the oral microbiota of patients with periodontitis and OSA are present as potential pathogens, promoting the development of dysbiotic microbiota and the occurrence of chronic diseases, which have been previously proposed to be common risk factors for periodontitis and OSA. Understanding the function of possible pathogens in the oral microbiota will require more research.

Keywords: periodontitis; obstructive sleep apnea; oral microbiota; pathogenic microbiota; chronic diseases; MALDI-TOF

1. Introduction

According to recent studies, patients with obstructive sleep apnea (OSA) have an increased risk of developing periodontitis [1,2]. Some hypotheses about the connection

between periodontitis and OSA include a genetic predisposition, an inflammatory response that both disorders share, and a change in the oral microbiota [3].

Individuals with OSA have a higher prevalence of increased periodontal parameters such as probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL), as well as an index of apnea–hypopnea (AHI) >15 events per hour, and they experience mouth-breathing-related oral dryness. In addition, these individuals have a microbiota characterized by an increase in Gram-negative bacteria, primarily periodontal pathogens [4,5]. It has been reported that the oral microbiota of patients with OSA is significantly different from that of individuals without OSA. The nasal microbiome of subjects with severe OSA was found to be altered and enriched with *Streptococcus*, *Prevotella*, and *Veillonella*. Several common oral commensals (*Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, and *Fusobacterium*) have been correlated with the apnea–hypopnea index [6]. Pyrosequencing has also been utilized to detect bacteria associated with OSA and hypertension, revealing the presence of *Porphyromonas* spp. and *Aggregatibacter* sp. in both mild and moderate–severe OSA [7]; both genera are associated with the development of periodontitis. Similar studies have found that patients with OSA have significantly higher levels of the *Scardovia* species [8], and that patients with OSA-comorbid hypertension have a different salivary microbiota, which includes the genera *Actinomyces*, *Absconditabacteria* (SR1) [G-1], *Granulicatella*, *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, and *Leptotrichia* [9].

Oral dryness affects bone remodeling triggered by hypoxia, with an increase in CO₂ levels [5], reducing the immune system's response to infections and allowing a higher diversity of microorganisms (bacteria and yeasts), which are capable of generating dysbiotic polymicrobial communities. Recent studies have found that individuals with OSA and periodontitis have higher levels of periodontal pathogenic bacteria [10] associated with yeasts such as *Candida* spp. [11]. Additionally, cryptic microbiota, which we describe as microorganisms that are not often considered significant oral pathogens and are not classified in the Socransky's microbial complexes [12], nor are they associated with specific pathologies in the oral cavity, have been identified in periodontitis and OSA [11]. These cryptic microorganisms could contribute to periodontitis development in OSA patients. Therefore, the following study hypothesized about these cryptic microorganisms, which could contribute to the modulation of oral microbiota present in health or disease (periodontitis and/or OSA patients). The purpose was to analyze the presence of these cultivable cryptic oral microorganisms in individuals with periodontitis associated with OSA and to identify potential pathogens in both conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Demographic data, clinical oral characteristics, and cultivable cryptic microorganisms identified by MALDI-TOF equipment (Microflex from[®] Bruker Daltonik Inc., Billerica, MA, USA) in three oral samples (saliva, subgingival plaque, and gingival sulcus) of participants from a previous study were available for re-analysis for this study. As previously described [11], participants were recruited from the Sleep Clinic of the Hospital Universitario San Ignacio and the Sleep Clinic of the Faculty of Dentistry at the Pontificia Universidad Javeriana-PUJ, Colombia. Participants with the following criteria were included: (1) adults over 30 years old, (2) individuals who have at least six teeth in their mouth, and (3) individuals who underwent a polysomnographic exam no more than six months ago. The following were the exclusion criteria: smokers, diabetics, individuals who recently took antibiotics, individuals who have had periodontal therapy in the past three months, individuals who use continuous positive airway pressure (CPAP) or bilevel positive airway pressure (BPAP), and individuals who have had pharmacological or surgical treatment for OSA. All participants were diagnosed by a sleep medicine pulmonologist and specialists in periodontics [11].

Inclusionary criteria were set to select completed clinical oral data of participants with cryptic microorganisms identified in their oral samples. Seventy-five participants that

fulfilled the inclusion criteria were assigned to one of four groups according to the severity of their OSA and their periodontal diagnosis, as follows: Group 1 (G1) (H) healthy patients: non-periodontitis and non-OSA ($n = 20$), Group 2 (G2) (P) periodontitis and non-OSA patients ($n = 13$), Group 3 (G3) (OSA) OSA and non-periodontitis patients ($n = 18$), and Group 4 (G4) (P-OSA) periodontitis and OSA patients ($n = 24$).

Three oral samples (saliva, subgingival plaque, and gingival sulcus) were obtained from patients' oral cavities as previously described [11], with no periodontal stimulation before the samples were taken (probing, prophylaxis, and calculus removal). The unstimulated saliva was collected in polypropylene tubes containing thioglycollate medium (Oxoid[®], Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). The gingival sulcus sample was taken after the area of the tooth of interest was relatively isolated using gauze and cotton rolls. This sample was obtained by inserting standard absorbent papers (Periopapers, Oral Flow[®], Plainview, NY, USA) into the periodontal sulcus for 30 s and vortexing them for 10 s to elute the Periopaper content into PBS before transferring them to polypropylene tubes with thioglycollate medium. Before collecting a sample of the subgingival plaque, the supragingival plaque was removed with a sterile curette and gauze. The subgingival plaque sample was then obtained with a curette and put into polypropylene tubes with thioglycollate media. The pellet from each oral sample was grown on Sabouraud agar (Merck[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and BBL Columbia Agar[™] with 5% sheep blood, and incubated at 37 °C for 2 and 7 days under aerobiosis and anaerobiosis conditions, respectively. At the conclusion of the incubation period, the MALDI Biotyper[®] system (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) was used to identify each type of microbial colony. The data from the 75 participants were earlier related by Corral et al, 2022 [11], and in this study, the data were analyzed in relation to cryptic oral microorganisms.

2.2. Data Register

The demographic data and clinical oral characteristics were recorded, including age, sex, and periodontal parameters: probing depth (PD), clinical attachment loss (CAL), plaque index (PI), bleeding of probing (BOP), and missing teeth. Additionally, the genera and species of cultivable cryptic oral microorganisms identified were recorded.

2.3. Statistical Analysis

The first part of the present study consisted in performing a descriptive statistic. Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was used to analyze the demographic data and periodontal parameters. In the second part, tests were carried out to compare the cultivable cryptic oral microorganisms between each group, determining the relative frequencies of cryptic microorganisms' genera and species. The cluster analysis of cryptic microbial communities by the group of patients was conducted using agglomerative hierarchical clustering (AHC) according to the frequency of the microorganisms. Principal coordinates Analysis (PCoA) was calculated by the relative abundance of microorganisms. Association tests were performed within each group using the Spearman r test ($p < 0.5$) to correlate periodontal parameters and the cultivable cryptic microorganisms. The software packages GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and XLSTAT statistical and data analysis solution (Addinsoft, New York, NY, USA) were used.

3. Results

3.1. Clinical Data

The demographic variables and periodontal parameters of the study population are presented in Table 1. There was a higher percentage of men in Group 4 (P-OSA) than in the other groups. Teeth with periodontitis (%), BOP (%), and PI showed statistically significant differences between Group 2 (P) and Group 4 (P-OSA) vs. Group 1 (H) ($p < 0.001$). In addition, the PI showed statistically significant differences between Group 3 (OSA) ($p < 0.001$) vs. Group 1 (H). Regarding the periodontal condition, dental-biofilm-induced gingivitis in reduced periodontium was more prevalent in patients in Group 1 (H) and

Group 3 (OSA) (56% and 79%, respectively). Stage III periodontitis was more prevalent in patients in Group 2 (P) and Group 4 (P-OSA) (65% and 81%, respectively) (Figure 1).

Table 1. Demographic variables and periodontal parameters of the group of patients.

Clinical Variable	Group 1 (H) (n = 20)	Group 2 (P) (n = 13)	Group 3 (OSA) (n = 18)	Group 4 (P-OSA) (n = 24)
Age (years)	44.35 ± 14.24	40.69 ± 10.83	50.35 ± 13.09	49.33 ± 11.65
Gender (Males) (%)	32	41	37	69
Missing teeth	6.21 ± 4.42	5.69 ± 2.25	8.53 ± 6.53	7.08 ± 6.23
Teeth with periodontitis (%)	2.18 ± 3.99	47.91 ± 24.72 *	1.37 ± 2.98 "	39.16 ± 19.39 * [§]
PD (mm)	1.81 ± 0.48	2.64 ± 0.45	2.36 ± 4.82	13.83 ± 9.95
Sites (%) PD ≥ 4 mm	0.29 ± 0.50	16.76 ± 10.62	2.01 ± 0.15	2.64 ± 0.41
CAL (mm)	1.33 ± 0.78	2.15 ± 1.01	1.52 ± 0.98	2.31 ± 1.14
BOP (%)	11.59 ± 11.46	49.19 ± 26.92 *	24.02 ± 22.96 "	48.67 ± 26.69 * [§]
PI	19.30 ± 11.48	47.21 ± 26.28 *	39.65 ± 21.43 *	39.16 ± 19.39 *

Values are given as mean ± standard deviation; Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$; PD: Probing depth; CAL: Clinical attachment loss; BOP: Bleeding of probing; PI: Plaque index; * Significantly different to Group 1; " Significantly different to Group 2; [§] Significantly different to Group 3.

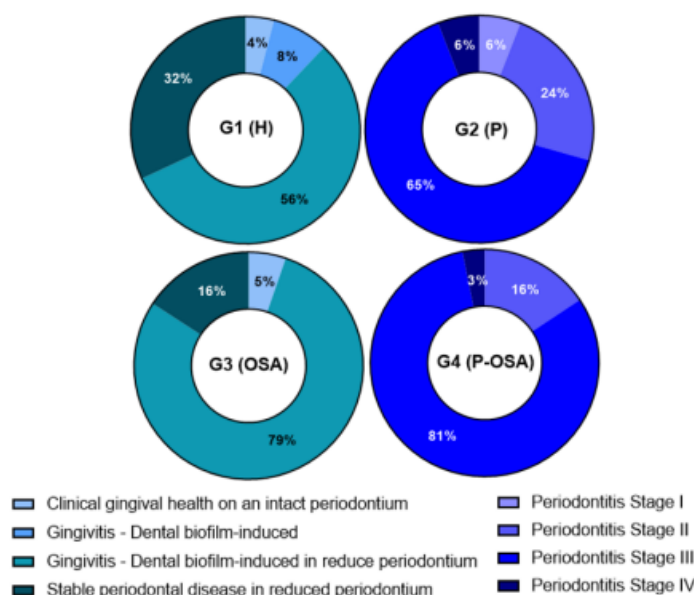


Figure 1. Percentage of patients of each group according to periodontal condition (according to the new Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions by G. Caton et al. 2018 [13]). G1 (H): healthy patients, non-periodontitis and non-OSA (n = 20); G2 (P) periodontitis and non-OSA patients (n = 13); G3: (OSA) OSA and non-periodontitis patients (n = 18); G4 (P-OSA) periodontitis and OSA patients (n = 24).

3.2. Microbiological Data

According to the total number of microorganisms per genus identified by group, the percentages of the cryptic microorganisms for each group of patients were adjusted to percentages of relative frequency (Figure 2). Each patient group has a unique microbiological profile that is primarily made up of the genera *Staphylococcus* spp. and

Cutibacterium spp.; the relative frequency of each genus ranged from 32 to 43% and 10 to 17%, respectively. The third most frequent genera in each group stood out as *Gemella* spp. (9%) in G1 (H), *Neisseria* spp. (10%) in G2 (P), *Rothia* spp., *Leuconostoc* spp. (7.5%) in G3 (OSA), and *Bifidobacterium* spp. and *Lactococcus* spp. (8.5%) in G4 (P-OSA). There was a decrease in the presence of four genera in G2 (P), G3 (OSA), and G4 (P-OSA) compared to G1 (H): *Staphylococcus* spp.: 3% decrease in G2 (P), 8.4% in G3 (OSA) and 11.5% in G4 (P-OSA); *Enterococcus* spp.: 2.3% decrease in G2 (P), 3.2% in G3 (OSA) and 5.7% in G4 (P-OSA); *Gemella* spp.: 9.4% decrease in G2 (P), 6.9% in G3 (OSA) and 7.3% in G4 (P-OSA); *Lachnoanaerobaculum* spp.: 7.6% decrease in G2 (P), 2.6% in G3 (OSA) and 5.4% in G4 (P-OSA). Otherwise, there was an increase in the presence of five genera in G2 (P), G3 (OSA), and G4 (P-OSA) compared to G1 (H): *Alloscardovia* spp.: 3.3% increase in G2 (P) and 4.3% in G4 (P-OSA); *Bifidobacterium* spp.: 0.6% increase in G3 (OSA) and 6.6% in G4 (P-OSA); *Corynebacterium* spp.: 0.6% increase in G3 (OSA); *Lactococcus* spp.: 0.6% increase in G3 (OSA) and 6.6% in G4 (P-OSA); *Leuconostoc* spp.: 5.6% increase in G3 (OSA) and 4.5% in G4 (P-OSA); *Propionibacterium* spp.: 0.6% increase in G3 (OSA) and 4.5% in G4 (P-OSA).

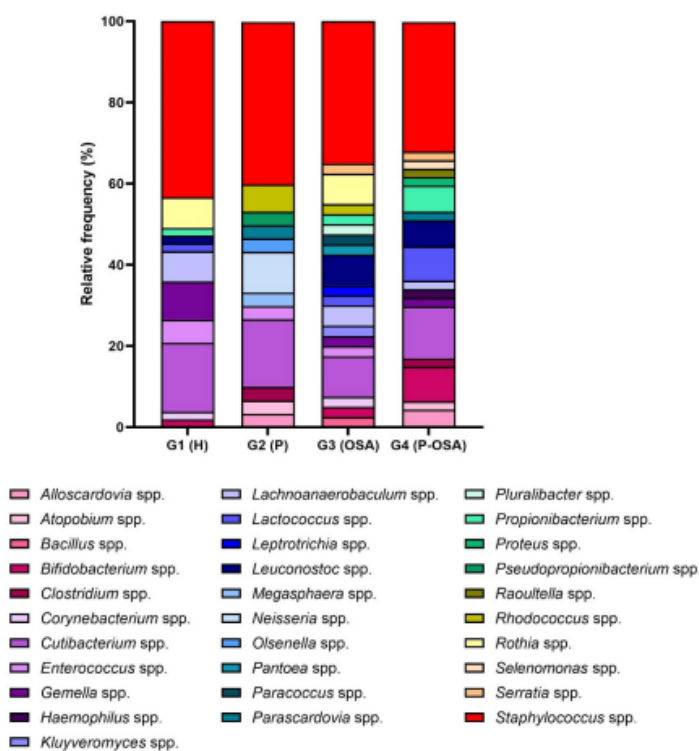


Figure 2. Microbial profile: percentage of each patient group's relative frequency of the genus of cultivable cryptic microorganisms (other microorganisms). G1 (H): healthy patients; G2 (P) periodontitis patients; G3: (OSA) OSA patients; G4 (P-OSA) periodontitis and OSA patients.

Some species were only identified in one of the four patient groups: (Table S1). Fifty-six species were found, distributed into thirty-one genera. The major diversity of species of cryptic microorganisms was identified in dental-biofilm-induced gingivitis in reduced periodontium (26 species) and in stage III periodontitis (25 species), with *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, and *Bifidobacterium dentium* being the most prevalent in both conditions (Figure 3).

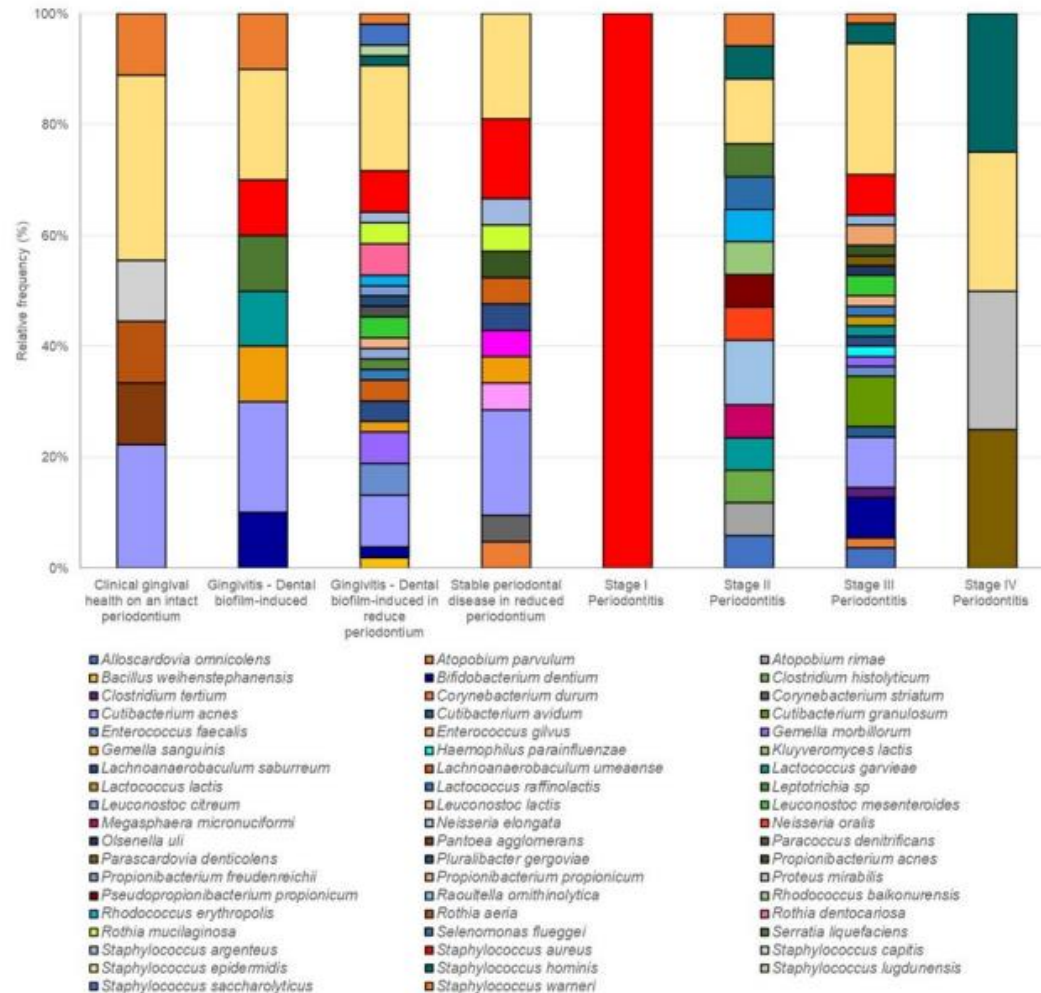


Figure 3. Microbial profile: percentage of relative frequency of each species of cultivable oral cryptic microorganisms by periodontal condition. Healthy conditions: clinical gingival health on an intact periodontium, dental-biofilm-induced gingivitis, dental-biofilm-induced gingivitis in reduced periodontium, Stable periodontal disease in reduced periodontium. Disease condition: periodontitis Stages I–IV.

The relative frequencies of microorganisms were analyzed using agglomerative hierarchical clustering (AHC) in order to classify cryptic microorganisms based on the microbial community makeup by patient group. The results of this study are depicted as a dendrogram (Figure 4), which illustrates the degree to which the community makeup differs and how the cryptic microorganisms clustered for each patient group. The ensuing G1 (H) and G2 (P) dendrograms revealed two major well-defined clusters. In Cluster 2, *Staphylococcus* spp., *Cutibacterium* spp., and *Enterococcus* spp. were shared by both groups. G3 (OSA) displayed four clusters, while G4 (P-OSA) displayed three clusters, with *Bifidobacterium* spp. constituting Cluster 1 in G3 (OSA) and Cluster 2 in G4 (P-OSA).

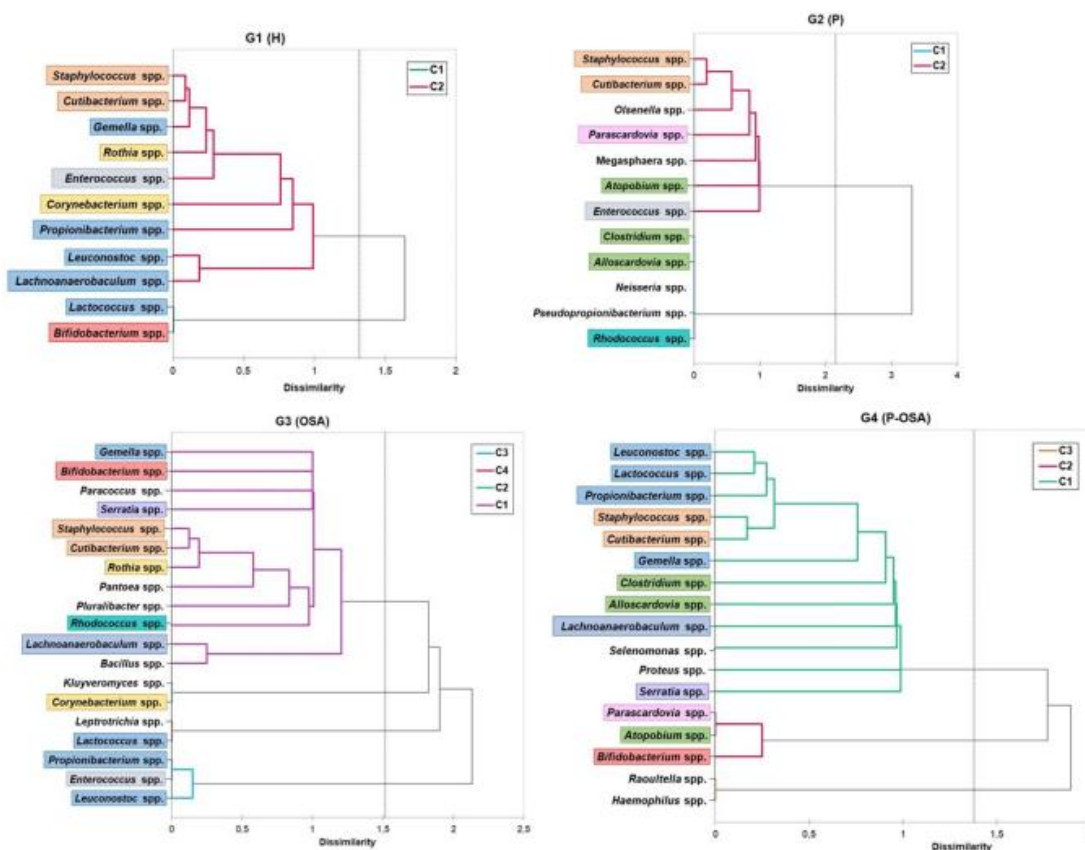


Figure 4. Microbial profiles dendrogram: clustering of oral cryptic microorganisms based on Euclidean distance dissimilarity matrix and agglomeration method of Ward (agglomerative hierarchical clustering (AHC)). The microorganisms present in two or more patient groups are indicated by color. Those without color were only identified in a group. C: cluster; G1 (H): healthy patients; G2 (P) periodontitis patients; G3: (OSA) OSA patients; G4 (P-OSA) periodontitis and OSA patients.

In order to observe the distributions of the cryptic microbiota in each category, PcoA was applied to the relative abundances in each group of patients (Figures S1–S4). The G1 scattering showed that Component 1 was defined by *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp. and *Gemella* spp., and Component 2 was defined by *Corynebacterium* spp. However, when applying marimax rotation, this component was redefined by *Lachnoanaerobaculum* spp. and *Leuconostoc* spp., the distribution for men and women being associated with Component 1. The G2 scattering showed that *Alloscardovia* spp., *Clostridium* spp., *Neisseria* spp., and *Pseudopropionibacterium* spp. Highly defined the first component, and the component was mainly defined by *Staphylococcus* spp. This was maintained in rotation, being directly associated with those of stage II periodontitis. The G3 scattering showed that Component 1 was defined by *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* spp., and *Propionibacterium* spp., being highly associated with moderate OSA and inversely with severe OSA and women. Component 2 was mainly defined by *Staphylococcus* spp., and this is maintained in rotation, being inversely associated with men. The G4 scattering showed that *Haemophilus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Raoultella* spp. Defined Component 2 with an associative pattern for men and women, while *Bifidobacterium* spp., *Atopobium* spp., and *Parascardovia* spp. Defined Component 1 with an association trend with severe OSA.

3.3. Association between Periodontal Parameters and the Cryptic Oral Microorganisms

This correlation between periodontal parameters and the genera of species of cryptic microorganisms present in the four groups of patients evaluated was found by the analysis of multicomponent matrices. The association can be positive (+) or negative (−) according to the Spearman correlation range (r_s). The r_s values over zero indicate a positive correlation in cyan tones, whereas r_s values below zero indicate a negative correlation in purple tones. (Figure 5, Table S2).

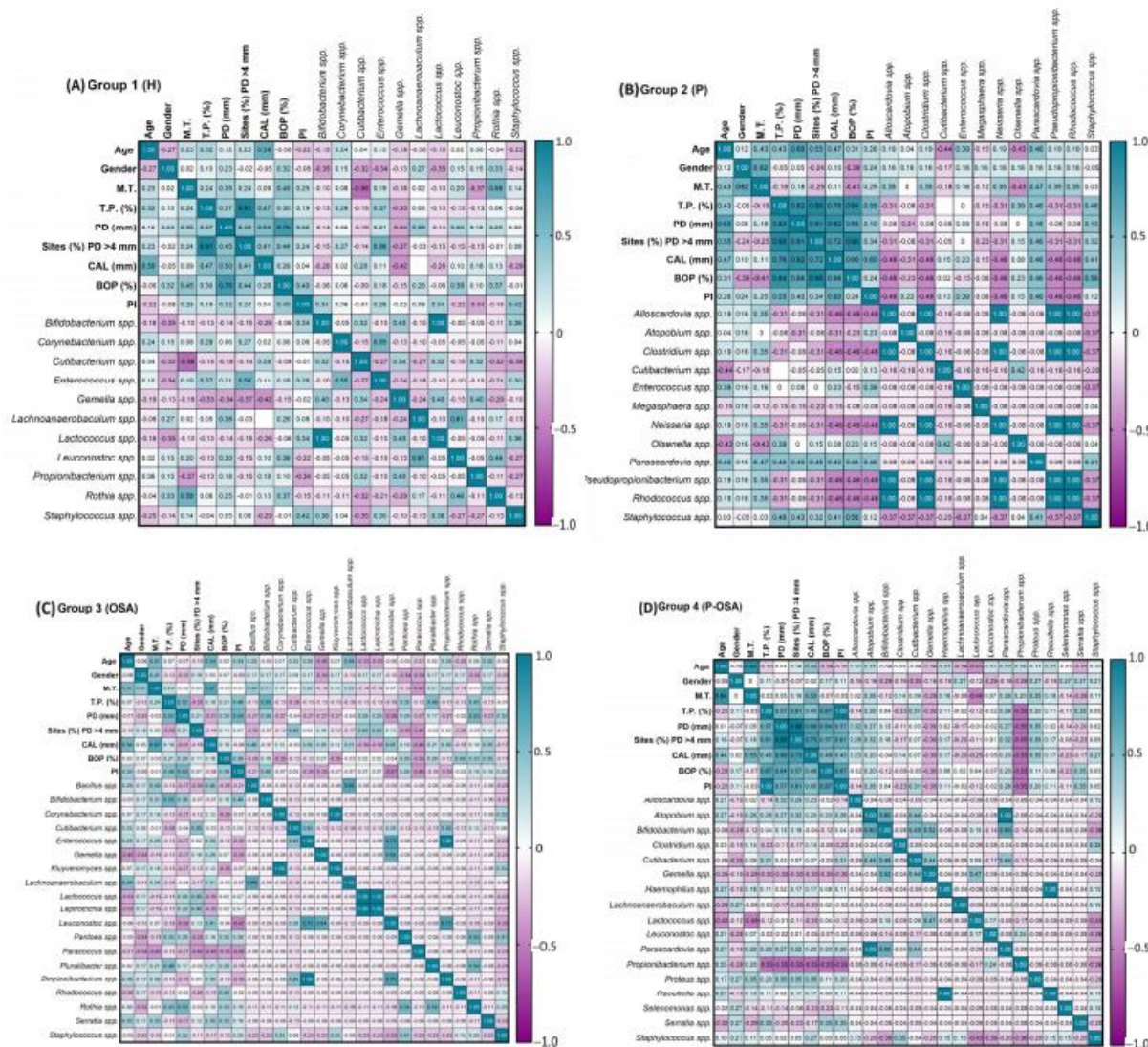


Figure 5. Multicomponent matrix for the correlation of periodontal parameters and oral cryptic microorganisms present in each of the groups of patients evaluated: (A) G1 (H), n = 20; (B) G2 (P), n = 13; (C) G3 (OSA), n = 18; (D) G4 (P-OSA), n = 24, using the Spearman's rank correlation coefficient $r_s > 0.30$, $p < 0.05$. The association can be positive (+) or negative (−) according to the Spearman correlation range (r_s). The r_s values over zero indicate a positive correlation in cyan tones, whereas r_s values below zero indicate a negative correlation in purple tones. M.T., Missing teeth; T.P., Teeth with periodontitis; PD: probing depth; CAL: clinical attachment loss; BOP: bleeding of probing; PI: plaque index.

In G1 (H), there was a positive, statistically significant correlation between missing teeth and *Rothia* spp. ($r_s = 0.58, p = 0.004$), PD (mm), and *Lachnoanaerobaculum* spp. ($r_s = 0.38, p = 0.047$), sites (%) PD > 4 mm and *Enterococcus* spp. ($r_s = 0.56, p = 0.006$), BOP (%) and *Leuconostoc* spp. ($r_s = 0.38, p = 0.048$), and PI and *Staphylococcus* spp. ($r_s = 0.42, p = 0.032$), whereas *Cutibacterium* spp. And missing teeth, and CAL and *Gemella* spp. Showed a negative statistically significant correlation ($r_s = -0.56, p = 0.005$ and $r_s = -0.42, p = 0.032$, respectively) (Figure 5A). In G2 (P), there was a positive correlation with statistical significance between *Staphylococcus* spp. And teeth with periodontitis (%) ($r_s = 0.46, p = 0.056$), as with BOP (%) ($r_s = 0.56, p = 0.026$) (Figure 5B). In G3 (OSA), there was a positive correlation with statistical significance between age and *Lachnoanaerobaculum* spp. ($r_s = 0.49, p = 0.018$), missing teeth and *Bacillus* spp. ($r_s = 0.40, p = 0.05$), teeth with periodontitis (%), and *Bifidobacterium* spp. ($r_s = 0.55, p = 0.01$), as with *Pluralibacter* spp. and *Rothia* spp. ($r_s = 0.48, p = 0.022$; $r_s = 0.43, p = 0.036$, respectively). In addition, PD (mm) and *Rothia* spp. ($r_s = 0.36, p = 0.011$), sites (%) PD > 4 mm, and *Cutibacterium* spp. ($r_s = 0.45, p = 0.03$), whereas there was a negative statistical significance between *Leuconostoc* spp. And PD (mm) ($r_s = -0.39, p = 0.046$), as with PI ($r_s = -0.47, p = 0.023$) (Figure 5C). In G4 (P-OSA), *Proteus* spp. Was correlated positively with missing teeth, PD (mm) and sites (%) PD > 4 mm ($r_s = 0.56, p = 0.026$). *Serratia* spp. Was correlated positively with teeth with periodontitis (%), BOP (%) and PI ($r_s = 0.35, p = 0.048$), whereas *Lactococcus* spp. Was correlated negatively with missing teeth ($r_s = -0.49, p = 0.008$) and *Propionibacterium* spp. With all the periodontal parameters ($r_s = -0.55, p = 0.003$) (Figure 5D).

4. Discussion

This study is the first to analyze the presence of microorganisms found in oral samples that are not often linked to oral diseases such as periodontitis related to OSA. A previous study [11] demonstrated that there was a greater diversity of microorganisms in oral samples from individuals with periodontitis and OSA, and showed the association between both diseases by sharing risk factors such as comorbidities and presence of the bacteria of the orange and red complexes, associated with *Candida albicans*. Additionally, this study identified cultivable cryptic microorganisms in healthy individuals (G1), individuals with periodontitis (G2), individuals with OSA (G3), and individuals with periodontitis and with OSA (G4), which describe as microorganisms that are not often considered significant oral pathogens and are not classified in Socransky's microbial complexes [12], nor are they associated with specific pathologies in the oral cavity; however, they could be microorganisms that contribute to periodontitis development in OSA patients and could be associated with other chronic pathologies. It is crucial to clarify the role and modulation of this diverse group of microorganisms [14–21], which goes beyond those first identified as periodontal pathogens, in both disease and pathogenicity, taking into consideration the effectiveness of current identification technologies. It is important to consider that cryptic microorganisms may or may not contribute to the health and emergence of periodontal disease or may not. To clarify the role of these microorganisms, the purpose of the current study was to analyze their presence in health or disease (periodontitis and/or OSA) and to identify potential pathogens.

The periodontal parameters BOP (%) and PI were highest in all groups of patients, compared to patients of G1, highlighting that the patients of G3 had an increased PI with a statistically significant difference ($p = 0.001$). This evidence suggests that OSA might favor oral biofilm formation, and is consistent with previous reports [22,23]. In addition, other study demonstrated that periodontal parameters such as PD (mm) and CAL were higher in patients with OSA [4], supporting the idea that OSA pathophysiology, which includes hypoxia, hypercapnia, and oral dryness, can contribute to the development of periodontitis.

According to the new Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions [13], the periodontal condition of the patients of each group was determined. The dental-biofilm-induced gingivitis in reduced periodontium was more frequent in G1 and G3 (56% and 79%, respectively). Meanwhile, stage III periodontitis was more frequent

in G2 and G4 (65% and 85%, respectively). These results suggest that OSA is a factor that increases the risk of periodontitis, and it is crucial to comprehend that OSA individuals should undergo periodic periodontal screenings. The percentage of the relative frequency of each species of cultivable oral cryptic microorganisms showed that dental-biofilm-induced gingivitis in reduced periodontium as a healthy condition and stage III periodontitis as a disease condition had major diversity of species.

There was evidence that the presence and absence of certain species vary depending on health and disease conditions, as a possible modulation between the cryptic microorganisms. According to the literature, the severity of OSA may be involved in the diversity and abundance of different species and genera of microorganisms [5]. This could be related to hypoxic episodes and an increase in CO₂ levels, which are consequences of apnea or hypopnea events, reflected in AHI, which determines the severity of OSA. The oral samples analyzed in a previous study [11] were taken at the same time in the morning to minimize potential influences on the microbiota's characterization and take into consideration the possibility of diurnal oscillations in their composition and function [24]. The experimental data obtained are reproducible once this factor is taken into consideration along with the sample collection techniques.

Different studies have reported alterations in oral microbiota evaluating just the saliva of patients with OSA. Nizam et al. reported the results of 13 patients without OSA, 17 patients with mild–moderate OSA, and 22 patients with severe OSA [5]. Ko et al. concluded oral microbiota changes from the saliva of 19 patients with OSA [25], and Chen et al. found alterations in the salivary microbiome in 26 patients with OSA comorbid hypertension [9]. In the current study, the oral microbiota data were complemented, analyzing three oral samples (saliva, subgingival plaque, and gingival sulcus) from 75 patients categorized into four groups based on the diagnosis of periodontitis and OSA: 20 healthy patients (G1), 13 patients with periodontitis (G2), 18 patients with OSA (G3), and 24 patients with periodontitis and OSA (G4). Therefore, the cryptic microorganisms identified were analyzed, according to the presence of each bacterium and its association with healthy or disease conditions, to identify potential pathogens, which may be related to the presence of periodontitis associated with OSA.

According to the results of the cluster conformation, periodontitis and OSA affect the diversity and distribution of cryptic microorganisms and unique genera in each group formed the majority of clusters. In G2 (P), both genera *Olsenella* spp. and *Megasphaera* spp. have been reported as periodontal pathogens. *M. micronuciformis* has been isolated from women suffering from preterm birth [26,27]. In G3 (OSA), the microorganisms *Paracoccus* spp., *Pantoea* spp., *Pluralibacter* spp., and *Bacillus* spp. are related to biofilm formation, abscess, bacteremia, pneumonia, urinary tract infection, septic arthritis, osteomyelitis, peritonitis, choledocholithiasis, dacryocystitis, and endophthalmitis [28]. *Bacillus* sp. Have pathogenic potential through the production of enterotoxins [15,29,30]. In G4 (P-OSA), *Selenomonas* spp. and *Proteus* spp. are related to pathogenesis of periodontal disease [31] and catheter-associated urinary tract infections (CAUTIs) [32], respectively. Furthermore, other microorganisms were found in each group, but in small clusters. In G2, the genus *Neisseria* spp. has been related to endocarditis and osteomyelitis [33], and *N. oralis* has been identified in systemic infection and cystitis in a diabetic adult [34]. *Leptotrichia* sp. (G3) has been related to periodontal disease and abscesses of the oral cavity, endocarditis, and septicemia [35], and *Kluyveromyces* sp. (G3) has been identified as a yeast producer of pGK1 killer toxin [36]. *Raoultella* spp. (G4) has been related to infected root canals and urinary, gastrointestinal, hepatobiliary, and osteoarticular infections [37], and *Haemophilus* spp. (G4) has been related to endocarditis, meningitis, pneumonia, otitis media, sinusitis, and epiglottitis [38]. The PcoA identified that *Alloscardovia* spp., *Clostridium* spp., *Neisseria* spp., and *Staphylococcus* spp. have been associated with stage III periodontitis in G2 (P). *Alloscardovia* spp. Has been related to dental caries [14], and *Clostridium* spp. has been related to gas gangrene, bacteremia, meningitis, septic arthritis, enterocolitis, spontaneous bacterial peritonitis, post-traumatic brain abscess, and pneumonia [16,17].

Enterococcus spp., *Leuconostoc* spp., and *Propionibacterium* spp. have been associated with moderate OSA in G3 (OSA). *Enterococcus* spp. has been related to endodontic disease, bacteremia, endocarditis, urinary tract infections, diabetic foot ulcers, and cholecystitis [20,21], and *Leuconostoc* spp. has been related to bacterial meningitis and bacteremia [39–41]. These results suggest that severe conditions of periodontitis and OSA may harbor microorganisms that favor the development of systemic infectious disease.

Regarding the cryptic microorganisms identified (Table S3) [18,19,42–48], *Staphylococcus* spp. and *Cutibacterium* spp. were the genera more common in all patient groups. However, it was clear that their abundance was higher in G1 compared to the other patients' groups. *Staphylococcus* spp. is frequent in skin and soft tissue infections, bloodstream infections, endocarditis, osteomyelitis, lung infection, suppurative diseases, pneumonia, prosthetic joint infections, and toxic shock syndrome [49–57]. *S. aureus* stands out in this genus, considered an opportunistic pathogen that is a part of the skin and nasal microbiota. It has been related to infectious diseases of the oral cavity, such as periodontitis [26], coinciding with the positive correlation found between *Staphylococcus* spp. and TP (%) and with BOP (%) in G2, and an in vitro study determined that *S. aureus* has the ability to bind to periodontal pathogenic bacteria, such as *F. nucleatum* and *P. gingivalis*, supporting the idea that *S. aureus* can become part of the complex oral microbiota and contribute to the development of oral infections [58].

The presence of *S. epidermidis* and *S. hominis* is associated with skin conditions such as atopic dermatitis or psoriasis; bloodstream infections, including endocarditis, peritonitis, and osteomyelitis; and infections of the bones and joints [52,53]. Both bacteria have been isolated from subgingival samples of healthy and periodontitis patients, without significant differences between both conditions [59], also supported by our results. The current study found that patients with periodontitis and OSA had lower levels of *Staphylococcus* spp. A highly diverse microbial community that influences the microenvironment and controls this bacterium's growth may be responsible for this bacterium's decline. Furthermore, a study found that *Staphylococcus* spp. increased during treatment with continuous positive airway pressure (CPAP), the primary therapy for OSA patients [25]. This finding might explain the increase of *Staphylococcus* spp. in healthy patients due to the restored microenvironment that favors its growth.

Gemella spp. is mainly linked to poor dental health, dental manipulation or surgery, colorectal disease or procedures, steroid therapy, diabetes mellitus, or hepatocellular dysfunction [60,61]. Moreover, *Gemella* spp. is also linked to septic arthritis and oral abscesses, which can result in serious endovascular infections such as endocarditis and pericarditis [62]. CPAP-using OSA patients were shown to have lower levels of this bacterium [25]. In contrast, the healthy patients (G1) in the current study had a higher prevalence of these bacteria than in the other patient groups. Like this, a study found a higher proportion of *Gemella* sp. in saliva from healthy patients than in the saliva obtained from periodontitis patients. This study demonstrated that *Gemella* sp. in saliva is linked to periodontal health and the protein components in *Gemella*'s culture supernatant directly inhibited *P. gingivalis*'s growth in vitro [63].

In the current study, *Cutibacterium* spp. and *Propionibacterium* spp. [64] were independently identified by MALDI-TOF. Infections in neurosurgical shunts, bone, breast, and prostate infections; infective endocarditis; splenic and cutaneous abscesses; and chronic blepharitis and endophthalmitis are all linked to *Cutibacterium* spp. [65–67]. *C. acnes* plays a role in the onset and development of Alzheimer's disease (AD) [68] and Parkinson's disease (PD) [69], and this bacterium has been demonstrated to be able to cross the blood–brain barrier through transcellular invasion in an in vitro study [70]. In addition, *C. acnes* is recognized for its ability to form biofilms on biomaterials in implanted medical devices, such as *C. albicans* [71]. These two microorganisms can establish polymicrobial biofilms that are synergistic, which enhances yeast resistance to miconazole [72]. The frequency of *C. albicans* and the percentage of biofilm were both higher in patients with periodontitis and OSA [11]; in this scenario, *C. acnes* could participate as a *C. albicans* protector, encouraging

the development of dysbiotic biofilms. This might lend to the notion that these opportunistic microorganisms behave in a way that makes it possible for periodontopathogen bacteria to colonize in periodontitis linked to OSA.

Propionibacterium spp. live on human skin as well as in the gastrointestinal and oral mucosa [73,74]. They have been linked to endocarditis and the infection of both natural and artificial valves [75], and are present in endodontic infections with a higher prevalence for secondary endodontic lesions [76]. In the current study, *Propionibacterium* spp. was identified in patients with OSA and patients with periodontitis and OSA, increasing by 0.61% in G3 and 4.5% in G4. The presence of this microorganism in individuals with OSA and those who also had periodontitis and OSA is reported for the first time in this study. Another study determined the presence of *Propionibacterium* spp. in apical periodontitis, forming a network of interactions with *Lactobacillus* spp. and different species of *Streptococcus* [77]. It is crucial to emphasize the link between the presence of this microorganism in co-association with other periodontal pathogens in periodontitis and OSA. According to reports [78,79], OSA is associated with chronic diseases such as AD and PD, primarily due to its potential neurodegenerative effects. In a similar vein, studies have suggested that periodontitis and AD may have a potential bidirectional relationship that may be caused by microorganisms [80]. The present study opens the possibility of establishing microbiological implications; for instance, the presence of *P. acnes* may play a role in the development and progression of this type of neurological disease in OSA patients.

Bifidobacterium spp. is usually related to dental caries, by acidogenic potential [81,82], and is a well-adapted commensal in the gastrointestinal tract. An earlier study determined that *Bifidobacterium dentium* is associated with an increased risk for gastrointestinal cancer [83], and along with *Lactobacillus*, *Bacteroides*, and *Prevotella*, was detected in OSA patients. It has also been implicated in obesity and diabetes [84]. Moreover, a substantial correlation between *B. dentium* abundance and pregnant women's salivary progesterone concentrations [85] and also pregnant women who had *B. dentium* had greater levels of IL-6 and IL-8 [86]. G3 and G4 had the highest frequency of *Bifidobacterium* sp. compared to G1 and G2, and it was positively correlated with teeth with periodontitis (%) and PI in G3 and the presence of *Cutibacterium* spp. in G4, indicating its pathogenic effect in both diseases, and microorganisms with *Atopobium* spp. [87,88] and *Parascardovia* spp. [89] showed an association trend with severe OSA.

Despite these findings, more research will be required to fully understand the connections between cryptic oral microorganisms and known oral pathogens in periodontitis associated with OSA, as well as their participation as risk factors.

5. Conclusions

This study reveals the existence of cryptic microorganisms and confirms that some of them are connected to a microbial profile of health, while others are more connected to a microbial profile of sickness. While *Gemella* spp. were connected to healthy conditions, *Cutibacteria* spp., *Propionibacterium* spp., and *Bifidobacterium* spp. were connected to disease profiles. *Staphylococcus* spp. prevalence in all patient categories may vary depending on the presence of other microorganisms. It was discovered that the illness profile contained microorganisms that might be categorized as possibly pathogenic and may have a role in the interaction between OSA, periodontitis, and other clinically significant chronic disorders or systemic infectious diseases. Understanding whether and how they will respond to health and disease is based on this reality.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijerph20031740/s1>, Figure S1: Principal coordinates analysis (PCoA) calculated by the relative abundance of microorganisms in G1 (H). Figure S2: Principal coordinates analysis (PCoA) calculated by the relative abundance of microorganisms in G2 (P). Figure S3: Principal coordinates analysis (PCoA) calculated by the relative abundance of microorganisms in G3 (OSA). Figure S4: Principal coordinates analysis (PCoA) calculated by the relative abundance of microorganisms in G4 (P-OSA). Table S1: Species identified in each group of patients. Table S2: Positive and negative correlations between the genera of microorganisms and periodontal parameters in each group of patients. Table S3: Identification of cryptic microorganism species and their relation to disease.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.T.C., E.H.D. and C.M.P.G.; methodology, M.A.T.C.; software, M.A.T.C. and E.H.D.; validation, M.A.T.C., N.S.R.M., L.O., M.E.C. and C.M.P.G.; formal analysis, M.A.T.C. and E.H.D.; resources, M.A.T.C., H.K.C.J., M.d.M.B.B., J.C.V. and P.H.M.; data curation, M.A.T.C., H.K.C.J., M.d.M.B.B. and J.C.V.; writing—original draft preparation, M.A.T.C.; writing—review and editing, M.A.T.C., N.S.R.M., L.O., M.E.C. and C.M.P.G.; visualization, C.M.P.G.; supervision, N.S.R.M., L.O., M.E.C. and C.M.P.G.; project administration, M.A.T.C.; funding acquisition, M.A.T.C. and L.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Pontificia Universidad Javeriana, grant number 008398.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We greatly appreciate the support given by the Training Agreement for postgraduate studies of professors of the Pontificia Universidad Javeriana for their doctoral training.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Khodadadi, N.; Khodadadi, M.; Zamani, M. Is Periodontitis Associated with Obstructive Sleep Apnea? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Exp. Dent.* **2022**, *14*, 359–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Verhelst, A.R.E.; Kosho, M.X.F.; Aarab, G.; Loos, B.G. Screening for the Risk of OSA in Periodontitis Patients. A Pilot Study. *Oral Health Prev. Dent.* **2022**, *20*, 243–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Al-Jewair, T.S.; Al-Jasser, R.; Almas, K. Periodontitis and Obstructive Sleep Apnea's Bidirectional Relationship: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sleep Breath* **2015**, *19*, 1111–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Seo, W.H.; Cho, E.R.; Thomas, R.J.; An, S.Y.; Ryu, J.J.; Kim, H.; Shin, C. The Association between Periodontitis and Obstructive Sleep Apnea: A Preliminary Study. *J. Periodontol Res.* **2013**, *48*, 500–506. [[CrossRef](#)]
5. Nizam, N.; Tasbakan, M.S.; Basoglu, O.K.; Lappin, D.F.; Buduneli, N. Is There an Association between Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Periodontal Inflammation? *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20*, 659–668. [[CrossRef](#)]
6. Wu, B.G.; Sulaiman, I.; Wang, J.; Shen, N.; Clemente, J.C.; Li, Y.; Laumbach, R.J.; Lu, S.; Udasin, I.; Le-hoang, O.; et al. Severe Obstructive Sleep Apnea Is Associated with Alterations in the Nasal Microbiome and an Increase in Inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *199*, 99–109. [[CrossRef](#)]
7. Ko, C.; Hu, A.; Huang, D.C.L.; Su, H.; Yan, F.; Zhang, X.; Zhang, H.; Zeng, Y. Analysis of Oral Microbiota in Patients with Obstructive Sleep Apnea-Associated Hypertension. *Hypertens. Res.* **2019**, *42*, 1692–1700. [[CrossRef](#)]
8. Jia, P.; Zou, J.; Yin, S.; Chen, F.; Yi, H.; Zhang, Q. Analysis of the Salivary Microbiome in Obstructive Sleep Apnea Syndrome Patients. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2020**, *2020*, 6682020. [[CrossRef](#)]
9. Chen, X.; Chen, Y.; Feng, M.; Huang, X.; Li, C.; Han, F.; Zhang, Q.; Gao, X. Altered Salivary Microbiota in Patients with Obstructive Sleep Apnea Comorbid Hypertension. *Nat. Sci. Sleep* **2022**, *14*, 593–607. [[CrossRef](#)]
10. Chen, Y.; Chen, X.; Huang, X.; Duan, Y.; Gao, H.; Gao, X. Analysis of Salivary Microbiome and Its Association With Periodontitis in Patients With Obstructive Sleep Apnea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 1–11. [[CrossRef](#)]
11. Tellez Corral, M.A.; Herrera Daza, E.; Cuervo Jimenez, H.K.; Arango Jimenez, N.; Morales Vera, D.Z.; Velosa Porras, J.; Latorre Uriza, C.; Escobar Arregoces, F.M.; Hidalgo Martínez, P.; Cortes, M.E.; et al. Patients with Obstructive Sleep Apnea Can Favor the Predisposing Factors of Periodontitis by the Presence P. Melaninogenica and C. Albicans, Increasing the Severity of the Periodontal Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25*, 134–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Caton, J.; Armitage, G.; Berglundh, T.; Chapple, I.L.C.; Jepsen, S.; S. Kornman, K.; L. Mealey, B.; Papapanou, P.N.; Sanz, M.; Tonetti, M.S. A New Classification Scheme for Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions – Introduction and Key Changes from the 1999 Classification. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, S1–S8. [[CrossRef](#)]
14. Ogawa, Y.; Koizumi, A.; Kasahara, K.; Lee, S.T.; Yamada, Y.; Nakano, R.; Yano, H.; Mikasa, K. Bacteremia Secondary to *Alloscardovia Omnicolens* Urinary Tract Infection. *J. Infect. Chemother.* **2016**, *22*, 424–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Stenfors, L.P.; Mayr, R.; Scherer, S.; Granum, P.E. Pathogenic Potential of Fifty *Bacillus Weihenstephanensis* Strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *215*, 47–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sárvári, K.P.; Schoblocher, D. The Antibiotic Susceptibility Pattern of Gas Gangrene-Forming *Clostridium* Spp. Clinical Isolates from South-Eastern Hungary. *Infect. Dis. (Auckl)* **2020**, *52*, 196–201. [[CrossRef](#)]
17. Milano, V.; Biehle, L.; Patel, S.; Hammer, J. *Clostridium Tertium* Bacteremia and Hepatic Abscess in a Non-Neutropenic Patient. *IDCases* **2019**, *15*, e00510. [[CrossRef](#)]
18. Qudeimat, M.A.; Alyahya, A.; Karched, M.; Behbehani, J.; Salako, N.O. Dental Plaque Microbiota Profiles of Children with Caries-Free and Caries-Active Dentition. *J. Dent.* **2021**, *104*, 103539. [[CrossRef](#)]
19. Alibi, S.; Ferjani, A.; Boukadida, J.; Cano, M.E.; Fernández-Martínez, M.; Martínez-Martínez, L.; Navas, J. Occurrence of *Corynebacterium Striatum* as an Emerging Antibiotic-Resistant Nosocomial Pathogen in a Tunisian Hospital. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9704. [[CrossRef](#)]
20. Chong, K.K.L.; Tay, W.H.; Janela, B.; Yong, A.M.H.; Liew, T.H.; Madden, L.; Keogh, D.; Barkham, T.M.S.; Ginhoux, F.; Becker, D.L.; et al. *Enterococcus Faecalis* Modulates Immune Activation and Slows Healing during Wound Infection. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, 1644–1654. [[CrossRef](#)]
21. Tyrrell, G.J.; Turnbull, L.A.; Teixeira, L.M.; Lefebvre, J.; Carvalho, M.d.G.S.; Facklam, R.R.; Lovgren, M. *Enterococcus Gilvus* Sp. Nov. and *Enterococcus Pallens* Sp. Nov. Isolated from Human Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 1140–1145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Loke, W.; Girvan, T.; Ingmundson, P.; Verrett, R.; Schoolfield, J.; Mealey, B.L. Investigating the Association Between Obstructive Sleep Apnea and Periodontitis. *J. Periodontol.* **2015**, *86*, 232–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gamsiz-Isik, H.; Kiyani, E.; Bingol, Z.; Baser, U.; Ademoglu, E.; Yalcin, F. Does Obstructive Sleep Apnea Increase the Risk for Periodontal Disease? A Case-Control Study. *J. Periodontol.* **2017**, *88*, 443–449. [[CrossRef](#)]
24. Thaïss, C.A.; Zeevi, D.; Levy, M.; Zilberman-Schapira, G.; Suez, J.; Tengeler, A.C.; Abramson, L.; Katz, M.N.; Korem, T.; Zmora, N.; et al. Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. *Cell* **2014**, *159*, 514–529. [[CrossRef](#)]
25. Ko, C.Y.; Hu, A.K.; Zhang, L.; Lu, X.L.; Zeng, Y.M. Alterations of Oral Microbiota in Patients with Obstructive Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome Treated with Continuous Positive Airway Pressure: A Pilot Study. *Sleep Breath.* **2022**, *26*, 811–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Vieira Colombo, A.P.; Magalhães, C.B.; Hartenbach, F.A.R.R.; Martins do Souto, R.; Maciel da Silva-Boghossian, C. Periodontal-Disease-Associated Biofilm: A Reservoir for Pathogens of Medical Importance. *Microb. Pathog.* **2016**, *94*, 27–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sato, N.; Kakuta, M.; Hasegawa, T.; Yamaguchi, R.; Uchino, E.; Kobayashi, W.; Sawada, K.; Tamura, Y.; Tokuda, I.; Murashita, K.; et al. Metagenomic Analysis of Bacterial Species in Tongue Microbiome of Current and Never Smokers. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2020**, *6*, 11. [[CrossRef](#)]
28. Büyükcak, A.; Tuncer, Ö.; Gür, D.; Sancak, B.; Ceyhan, M.; Cengiz, A.B.; Kara, A. Clinical and Microbiological Characteristics of *Pantoea Agglomerans* Infection in Children. *J. Infect. Public Health* **2018**, *11*, 304–309. [[CrossRef](#)]
29. Morinaga, K.; Yoshida, K.; Takahashi, K.; Nomura, N.; Toyofuku, M. Peculiarities of Biofilm Formation by *Paracoccus Denitrificans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 2427–2433. [[CrossRef](#)]
30. Freire, M.P.; De Oliveira Garcia, D.; Cury, A.P.; Spadão, F.; Di Gioia, T.S.R.; Francisco, G.R.; Bueno, M.F.C.; Tomaz, M.; De Paula, F.J.; De Faro, L.B.; et al. Outbreak of IMP-Producing Carbapenem-Resistant *Enterobacter Gergoviae* among Kidney Transplant Recipients. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 2577–2585. [[CrossRef](#)]
31. Enigk, K.; Jentsch, H.; Rodloff, A.C.; Eschrich, K.; Stingu, C.S. Activity of Five Antimicrobial Peptides against Periodontal as Well as Non-Periodontal Pathogenic Strains. *J. Oral Microbiol.* **2020**, *12*, 1829405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Armbruster, C.E.; Mobley, H.L.T.; Pearson, M.M.; Arbor, A.; States, U.; States, U. Pathogenesis of *Proteus Mirabilis* Infection. *EcoSal Plus.* **2018**, *8*, 1–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Spielman, A.F.; Ghuman, A.; Panthaki, Z.; Lessard, A.S. *Neisseria Elongata* Osteomyelitis: Literature Review and Case Report in a 63-Year-Old Male Presenting with Progressive Right-Handed Redness, Swelling and Pain. *Int. J. Surg. Case Rep.* **2020**, *73*, 228–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Baniulyte, G.; Svirpliene, S.; Eccleston, A.; Arjunan, S.; Connor, M. *Neisseria Oral* Septicaemia in a Newborn: First Recorded Case. *Paediatr. Int. Child Health* **2021**, *41*, 226–227. [[CrossRef](#)]
35. Eribe, E.R.K.; Olsen, I. *Leptotrichia* Species in Human Infections II. *J. Oral Microbiol.* **2017**, *9*, 1368848. [[CrossRef](#)]
36. Spohner, S.C.; Schaum, V.; Quitmann, H.; Czermak, P. *Kluyveromyces Lactis*: An Emerging Tool in Biotechnology. *J. Biotechnol.* **2016**, *222*, 104–116. [[CrossRef](#)]
37. Sękowska, A. *Raoultella* Spp.—Clinical Significance, Infections and Susceptibility to Antibiotics. *Folia Microbiol.* **2017**, *62*, 221–227. [[CrossRef](#)]

38. Finch, L.C.; Gerdzhikov, S.; Buttery, R. Haemophilus Parainfluenzae Endocarditis Presenting with Symptoms of COVID-19. *BMJ Case Rep.* **2021**, *14*, 4–9. [[CrossRef](#)]
39. Modaweb, A.; Mansoor, Z.; Alsanhan, A.; Abuhammour, W. A Case of Successfully Treated Central Line-Associated Bloodstream Infection Due to Vancomycin-Resistant Leuconostoc Citreum in a Child With Biliary Atresia. *Cureus* **2022**, *14*, 12–15. [[CrossRef](#)]
40. Omori, R.; Fujiwara, S.; Ishiyama, H.; Kuroda, H.; Kohara, N. Leuconostoc Lactis- A Rare Cause of Bacterial Meningitis in an Immunocompromised Host. *Intern. Med.* **2020**, *59*, 2935–2936. [[CrossRef](#)]
41. Meneguetti, M.G.; Gaspar, G.G.; Laus, A.M.; Basile-Filho, A.; Bellissimo-Rodrigues, F.; Auxiliadora-Martins, M. Bacteremia by Leuconostoc Mesenteroides in an Immunocompetent Patient with Chronic Chagas Disease: A Case Report. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 13–15. [[CrossRef](#)]
42. Grenier, D. Porphyromonas Gingivalis Outer Membrane Vesicles Mediate Coaggregation and Piggybacking of Treponema Denticola and Lachnoanaerobaculum Saburreum. *Int. J. Dent.* **2013**, *2013*, 305476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Meyburgh, C.M.; Bragg, R.R.; Eoucher, C.E. Lactococcus Garvieae: An Emerging Bacterial Pathogen of Fish. *Dis. Aquat. Organ.* **2017**, *123*, 67–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Baba, H.; Nada, T.; Ohkusu, K.; Ezaki, T.; Hasegawa, Y.; Paterson, D.L. First Case of Bloodstream Infection Caused by Rhodococcus Erythropolis. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 2667–2669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Greve, D.; Moter, A.; Kleinschmidt, M.C.; Pfäfflin, F.; Stegemann, M.S.; Kursawe, L.; Grubitzsch, H.; Falk, V.; Kikhney, J. Rothia Aeria and Rothia Dentocariosa as Biofilm Builders in Infective Endocarditis. *Int. J. Med. Microbiol.* **2021**, *311*, 151478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Franconieri, F.; Join-Lambert, O.; Creveuil, C.; Auzou, M.; Labombarda, F.; Aouba, A.; Verdon, R.; de La Blanchardière, A. Rothia Spp. Infective Endocarditis: A Systematic Literature Review. *Med. Mal. Infect.* **2020**, *51*, 228–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Uranga, C.C.; Arroyo, P.; Gerwick, W.; Edlund, A. Commensal Oral Rothia Mucilaginosa Produces Enterobactin, a Metal-Chelating Siderophore. *Host-Microbe Biol.* **2020**, *5*, e00161-20. [[CrossRef](#)]
48. Begrem, S.; Jérôme, M.; Leroi, F.; Delbarre-Ladrat, C.; Grovel, O.; Passerini, D. Genomic Diversity of Serratia Proteamaculans and Serratia Liquefaciens Predominant in Seafood Products and Spoilage Potential Analyses. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *354*, 109326. [[CrossRef](#)]
49. Jiang, B.; You, B.; Tan, L.; Yu, S.; Li, H.; Bai, G.; Li, S.; Rao, X.; Xie, Z.; Shi, X.; et al. Clinical Staphylococcus Argenteus Develops to Small Colony Variants to Promote Persistent Infection. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)]
50. Ahmad-Mansour, N.; Loubet, P.; Pouget, C.; Dunyach-Remy, C.; Sotto, A.; Lavigne, J.P.; Molle, V. Staphylococcus Aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins* **2021**, *13*, 677. [[CrossRef](#)]
51. Cui, B.; Smooker, P.M.; Rouch, D.A.; Daley, A.J.; Deighton, M.A. Differences between Two Clinical Staphylococcus Capitis Subspecies as Revealed by Biofilm, Antibiotic Resistance, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiling. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 9–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Brescò, M.S.; Harris, L.G.; Thompson, K.; Stanic, B.; Morgenstern, M.; O'Mahony, L.; Richards, R.G.; Moriarty, T.F. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus Epidermidis Device-Related Infection. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Szczuka, E.; Krzyżmińska, S.; Bogucka, N.; Kaznowski, A. Multifactorial Mechanisms of the Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus Hominis Isolated from Bloodstream Infections. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **2018**, *111*, 1259–1265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Parthasarathy, S.; Shah, S.; Raja Sager, A.; Rangan, A.; Durugu, S. Staphylococcus Lugdunensis: Review of Epidemiology, Complications, and Treatment. *Cureus* **2020**, *12*, 6–13. [[CrossRef](#)]
55. Wang, P.; Liu, Y.; Xu, Y.; Xu, Z. Staphylococcus Saccharolyticus Infection: Case Series with a PRISMA-Compliant Systemic Review. *Medicine* **2020**, *99*, e20686. [[CrossRef](#)]
56. Kanuparth, A.; Challa, T.; Meegada, S.; Siddamreddy, S.; Muppidi, V. Staphylococcus Warneri: Skin Commensal and a Rare Cause of Urinary Tract Infection. *Cureus* **2020**, *12*, e8337. [[CrossRef](#)]
57. Lisowska-Lysiak, K.; Lauterbach, R.; Międzobrodzki, J.; Kosecka-Strojek, M. Epidemiology and Pathogenesis of Staphylococcus Bloodstream Infections in Humans: A Review. *Polish J. Microbiol.* **2021**, *70*, 13–23. [[CrossRef](#)]
58. Lima, B.P.; Hu, L.L.; Vreeman, G.W.; Weibel, D.B.; Lux, R. The Oral Bacterium Fusobacterium Nucleatum Binds Staphylococcus Aureus and Alters Expression of the Staphylococcal Accessory Regulator SarA. *Microb. Ecol.* **2019**, *78*, 336–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Murdoch, F.E.; Sammons, R.L.; Chapple, I.L.C. Isolation and Characterization of Subgingival Staphylococci from Periodontitis Patients and Controls. *Oral Dis.* **2004**, *10*, 155–162. [[CrossRef](#)]
60. Taimur, S.; Madaha, R.; Samar, F.; Bushra, J. Gemella Morbillorum Endocarditis in a Patient with a Bicuspid Aortic Valve. *Hell. J. Cardiol.* **2010**, *51*, 183–186. [[CrossRef](#)]
61. Maraki, S.; Plevritaki, A.; Kofteçidiz, D.; Scoulica, E.; Eskitzis, A.; Gikas, A.; Panagiotakis, S.H. Bicuspid Aortic Valve Endocarditis Caused by Gemella Sanguinis: Case Report and Literature Review. *J. Infect. Public Health* **2019**, *12*, 304–308. [[CrossRef](#)]
62. Collins, M.D. The Genus Gemella. In *Prokaryotes*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2006; Volume 6, pp. 197–214.
63. Miyoshi, T.; Oge, S.; Nakata, S.; Ueno, Y.; Ukita, H.; Kousaka, R.; Miura, Y.; Yoshinari, N.; Yoshida, A. Gemella Haemolysans Inhibits the Growth of the Periodontal Pathogen Porphyromonas Gingivalis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–12. [[CrossRef](#)]

64. Broly, M.; Ruffier d'Epenoux, L.; Guillouzoic, A.; Le Gargasson, G.; Juvin, M.E.; Leroy, A.G.; Bémer, P.; Corvec, S. Propionibacterium/Cutibacterium Species-Related Positive Samples, Identification, Clinical and Resistance Features: A 10-Year Survey in a French Hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 1357–1364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Corvec, S. Clinical and Biological Features of Cutibacterium (Formerly Propionibacterium) Avidum, an Underrecognized Microorganism Stéphane. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00064-17. [[CrossRef](#)]
66. Mayslich, C.; Grange, P.A. Cutibacterium Acnes as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors. *Microorganisms* **2021**, *9*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Singh, M.; Teles, F.; Uzel, N.G.; Papas, A. Characterizing Microbiota from Sjögren's Syndrome Patients. *JDR Clin. Transl. Res.* **2021**, *6*, 324–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Emery, D.C.; Shoemark, D.K.; Batstone, T.E.; Waterfall, C.M.; Coghill, J.A.; Cerajewska, T.L.; Davies, M.; West, N.X.; Allen, S.J. 16S RRNA next Generation Sequencing Analysis Shows Bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 195. [[CrossRef](#)]
69. Leheste, J.R.; Ruvolo, K.E.; Chrostowski, J.E.; Rivera, K.; Husko, C.; Miceli, A.; Selig, M.K.; Brüggemann, H.; Torres, G.P. Acnes-Driven Disease Pathology: Current Knowledge and Future Directions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 81. [[CrossRef](#)]
70. Lu, X.; Qi, X.; Yi, X.; Jian, Z.; Gao, T. Transcellular Traversal of the Blood-Brain Barrier by the Pathogenic Propionibacterium Acnes. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 8457–8465. [[CrossRef](#)]
71. Bernard, C.; Lemoine, V.; Hoogenkamp, M.A.; Girardot, M.; Krom, B.P.; Imbert, C. Candida Albicans Enhances Initial Biofilm Growth of Cutibacterium Acnes under Aerobic Conditions. *Biofouling* **2019**, *35*, 350–360. [[CrossRef](#)]
72. Bernard, C.; Renaudeau, N.; Mollichella, M.L.; Quillard, N.; Girardot, M.; Imbert, C. Cutibacterium Acnes Protects Candida Albicans from the Effect of Micafungin in Biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *52*, 942–946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. McDowell, A.; McLaughlin, J.; Layton, A.M. Is Cutibacterium (Previously Propionibacterium) Acnes a Potential Pathogenic Factor in the Aetiology of the Skin Disease Progressive Macular Hypomelanosis? *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2021**, *35*, 338–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Suzuki, H.; Arshava, E.V.; Ford, B.; Nauseef, W.M. Don't Let Its Name Fool You: Relapsing Thoracic Actinomycosis Caused by Pseudopropionibacterium Propionicum (Formerly Propionibacterium Propionicum). *Am. J. Case Rep.* **2019**, *20*, 1961–1965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Clayton, J.J.; Baig, W.; Reynolds, G.W.; Sandoe, J.A.T. Endocarditis Caused by Propionibacterium Species: A Report of Three Cases and a Review of Clinical Features and Diagnostic Difficulties. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 981–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Dioguardi, M.; Alovisi, M.; Crincoli, V.; Aiuto, R.; Malagnino, G.; Quarta, C.; Laneve, E.; Sovereto, D.; Russo, L.L.; Troiano, G.; et al. Prevalence of the Genus Propionibacterium in Primary and Persistent Endodontic Lesions: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 739. [[CrossRef](#)]
77. Korona-Glowniak, I.; Piatek, D.; Fornal, E.; Lukowiak, A.; Gerasymchuk, Y.; Kedziora, A.; Bugla-Płoskowska, G.; Grywalska, E.; Bachanek, T.; Malm, A. Patterns of Oral Microbiota in Patients with Apical Periodontitis. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2707. [[CrossRef](#)]
78. Elfil, M.; Bahbah, E.I.; Attia, M.M.; Eldokmak, M.; Koo, B.B. Impact of Obstructive Sleep Apnea on Cognitive and Motor Functions in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* **2021**, *36*, 570–580. [[CrossRef](#)]
79. Ferini-Strambi, L.; Hensley, M.; Salsone, M. Decoding Causal Links Between Sleep Apnea and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers. Dis.* **2021**, *80*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Liccardo, D.; Marzano, F.; Carraturo, F.; Guida, M.; Femminella, G.D.; Bencivenga, L.; Agrimi, J.; Addonizio, A.; Melino, I.; Valletta, A.; et al. Potential Bidirectional Relationship Between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 683. [[CrossRef](#)]
81. Manome, A.; Abiko, Y.; Kawashima, J.; Washio, J.; Fukumoto, S.; Takahashi, N. Acidogenic Potential of Oral Bifidobacterium and Its High Fluoride Tolerance. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1099. [[CrossRef](#)]
82. Ventura, M.; Turrone, F.; Zomer, A.; Foroni, E.; Giubellini, V.; Bottacini, F.; Canchaya, C.; Claesson, M.J.; He, F.; Mantzourani, M.; et al. The Bifidobacterium Dentium Bd1 Genome Sequence Reflects Its Genetic Adaptation to the Human Oral Cavity. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000785. [[CrossRef](#)]
83. Wu, J.; Zhang, C.; Xu, S.; Xiang, C.; Wang, R.; Yang, D.; Lu, B.; Shi, L.; Tong, R.; Teng, Y.; et al. Fecal Microbiome Alteration May Be a Potential Marker for Gastric Cancer. *Dis. Markers* **2020**, *2020*, 3461315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Zhang, X.; Wang, S.; Xu, H.; Yi, H.; Guan, J.; Yin, S. Metabolomics and Microbiome Profiling as Biomarkers in Obstructive Sleep Apnoea: A Comprehensive Review. *Eur. Respir. Rev.* **2021**, *30*, 200–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Kato, S.; Nagasawa, T.; Uehara, O.; Shimizu, S.; Sugiyama, N.; Hasegawa-Nakamura, K.; Noguchi, K.; Hatae, M.; Kakinoki, H.; Furuichi, Y. Increase in Bifidobacterium Is a Characteristic of the Difference in the Salivary Microbiota of Pregnant and Non-Pregnant Women. *BMC Oral Health* **2022**, *22*, 260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Galley, J.D.; Mashburn-Warren, L.; Blalock, L.C.; Lauber, C.L.; Carroll, J.E.; Ross, K.M.; HobeI, C.; Coussons-Read, M.; Dunkel Schetter, C.; Gur, T.L. Maternal Anxiety, Depression and Stress Affects Offspring Gut Microbiome Diversity and Bifidobacterial Abundances. *Brain. Behav. Immun.* **2022**, *107*, 253–264. [[CrossRef](#)]
87. Yachida, S.; Mizutani, S.; Shirota, H.; Shiba, S.; Nakajima, T.; Sakamoto, T.; Watanabe, H.; Masuda, K.; Nishimoto, Y.; Kubo, M.; et al. Metagenomic and Metabolomic Analyses Reveal Distinct Stage-Specific Phenotypes of the Gut Microbiota in Colorectal Cancer. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 968–976. [[CrossRef](#)]

-
88. Chen, J.; Wu, X.; Zhu, D.; Xu, M.; Yu, Y.; Yu, L.; Zhang, W. Microbiota in Human Periodontal Abscess Revealed by 16S rDNA Sequencing. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1723. [[CrossRef](#)]
 89. Oshima, K.; Hayashi, J.I.; Toh, H.; Nakano, A.; Omori, E.; Hattori, Y.; Morita, H.; Honda, K.; Hattori, M. Complete Genome Sequence of *Scardovia Inopinata* JCM 12537T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announc.* **2015**, *3*, 5–6. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.2 Capítulo 2.

4.2.1 Descripción artículo 3:

Artículo 3: Biomarcadores de la severidad de la enfermedad periodontal en pacientes con apnea obstructiva del sueño: IL-1 β , IL-6, IL-17A e IL-33

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio anterior, donde se estableció un perfil microbiológico, con una alteración de la microbiota oral cultivable en individuos con AOS, toma mayor fuerza la hipótesis que las condiciones fisiopatológicas generadas por este trastorno (sequedad oral, hipoxia e hipercapnia), harían parte de los factores de riesgo para la periodontitis. Al respecto, se plantea otro vínculo de asociación entre la periodontitis y la AOS; los procesos inflamatorios producidos en parte como respuesta a la alteración de la microbiota oral, podrían generar un incremento de marcadores inflamatorios como las citocinas. De este modo, en aras de determinar un perfil inflamatorio, el objetivo de este estudio fue comparar las concentraciones de cinco citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-33 y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) en saliva y Fluido Crevicular Gingival (FCG) en individuos con AOS y su asociación con la periodontitis.

A partir de la saliva y FCG de 84 adultos clasificados en cuatro grupos según el diagnóstico clínico: Grupo 1 (H) (23 individuos sanos), Grupo 2 (P) (17 individuos con periodontitis), Grupo 3 (OSA) (18 individuos con AOS) y Grupo 4 (P-OSA) (26 individuos con periodontitis y con AOS), se realizó la cuantificación de las cinco citocinas por el ensayo Luminex (Multiplex bead assay) y se realizaron análisis para determinar diferencias entre las dos muestras evaluadas, la relación de la presencia de las citocinas con los parámetros periodontales determinados para cada grupo de individuos, la severidad de periodontitis y de AOS, y su relación con la presencia de *Candida* spp.

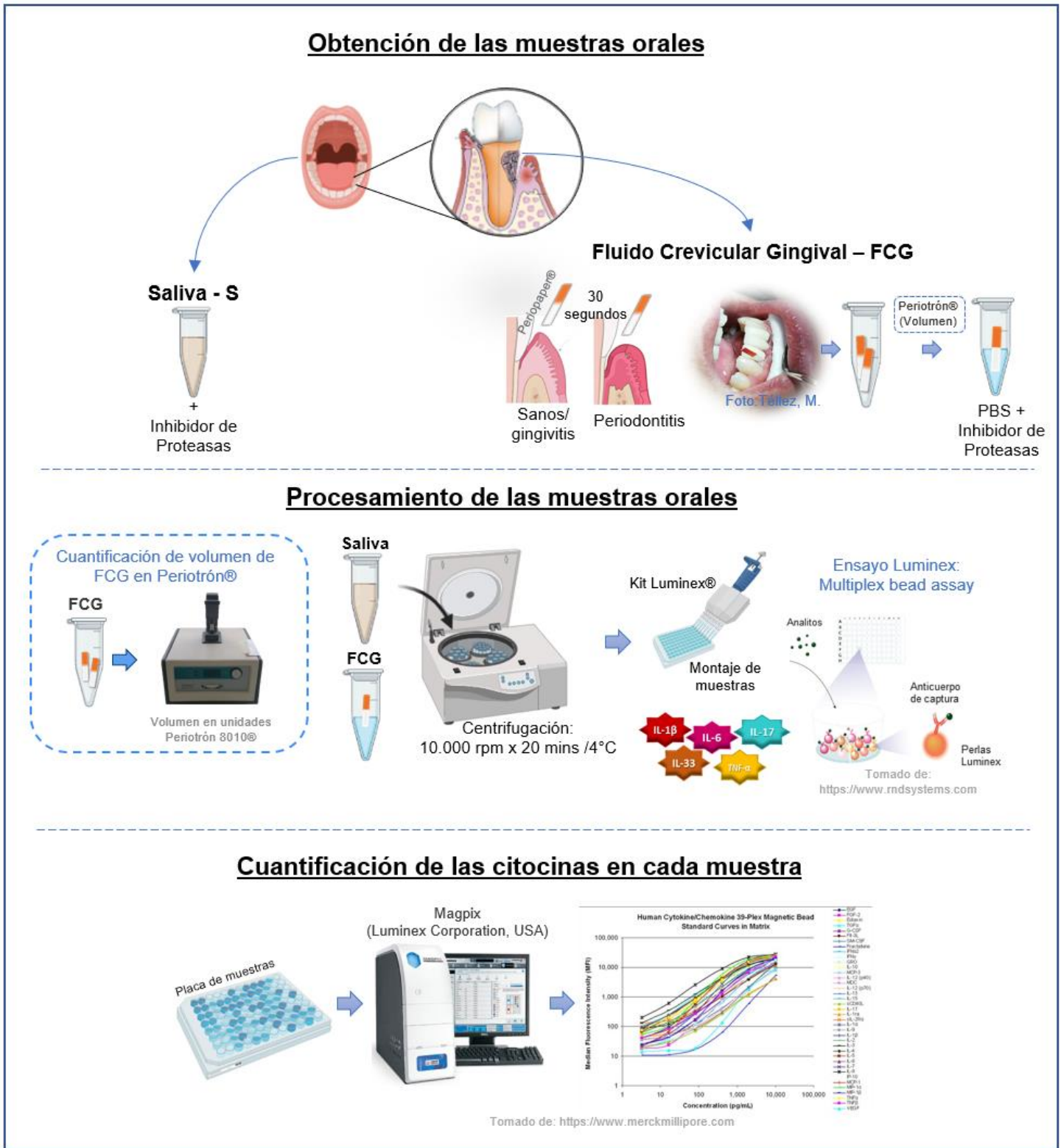
Se observaron niveles similares de IL-1 β e IL-6 en saliva de los individuos del Grupo 2 (P) y Grupo 4 (P-OSA). Los niveles de IL-6, IL-17A e IL-33 fueron mayores en el FCG de los individuos del Grupo 4 (P-OSA). Además, se evidenció una correlación positiva significativa entre IL-33 en saliva y periodontitis en estadio IV en el Grupo 4 (P-OSA). Por otro lado, al analizar el perfil de citocinas de los individuos del Grupo 4 (P-OSA), a quienes se les identificó *Candida* spp., se logró evidenciar un aumento de los niveles de todas las citocinas en FCG, en comparación con aquellos sujetos que no tenían esta levadura. La presencia de *Candida* spp. estuvo asociada con mayores

niveles de IL-17A y IL-33 en FCG de individuos con P-AOS, de tal forma que podría empeorar la enfermedad periodontal. Este incremento está reportado en la inmunidad antifúngica de IL-17A y IL-33 en respuesta a infecciones sistémicas por *Candida albicans*. Por un lado, el incremento de IL-33 también podría ser la causa del aumento de la IL-1 β e IL-6 y, por otro lado, la microbiota oral disbiótica causa el aumento de la IL-17A. Los altos niveles de IL-17A se correlacionaron positivamente con los parámetros periodontales como la profundidad de sondaje (mm) (PD) y el porcentaje de sangrado al sondaje (BOP%). Se destaca que este estudio reporta por primera vez los niveles de IL-17A en FCG, los cuales fueron altos en los individuos con AOS (OSA) y en los individuos con periodontitis y con AOS (P-OSA).

La IL-17A es secretada por las células de memoria Th17, que tienen una acumulación oral homeostática en presencia de IL-6. La proliferación de estas células requiere de la presencia de IL-6 e IL-23 para aumentar la producción de IL-17A. Esta citocina tiene potentes propiedades osteoclastogénicas e inflamatorias de destrucción ósea y tejido conectivo en el periodonto, debido a su capacidad para estimular la expresión de RANKL en los osteoblastos y la destrucción del tejido conectivo, al inducir la expresión de las metaloproteinasas de matriz en fibroblastos. Por otra parte, existen estudios que han demostrado que la IL-23 se incrementa significativamente en el suero de pacientes con AOS, y tiene una correlación positiva con el IAH y la proteína C reactiva (PCR), lo que sugiere que niveles elevados de IL-23 en individuos con AOS podrían estar estimulando la producción de la IL-17A, que está involucrada en el desarrollo de la periodontitis.

Niveles elevados de IL-1 β e IL-6 en saliva e IL-6, IL-17A e IL-33 en FCG en pacientes con AOS, podrían incrementar el riesgo de desarrollar periodontitis, debido a su actividad osteoclastogénica. Es así, que estas citocinas podrían proponerse como biomarcadores de AOS y periodontitis. Por último, se sugiere que los individuos con AOS se sometan a exámenes periodontales regulares y los individuos con periodontitis se sometan a revisiones para el diagnóstico de AOS.

Figura 6. Desarrollo metodológico Artículo 3.



4.2.1.1 Artículo 3

Heliyon 9 (2023) e14340



Contents lists available at ScienceDirect

Heliyon

journal homepage: www.cell.com/heliyon

Research article

Biomarkers for the severity of periodontal disease in patients with obstructive sleep apnea: IL-1 β , IL-6, IL-17A, and IL-33

Mayra A. Téllez Corral ^{a,e,f,*}, Eddy Herrera Daza ^b, Natalia Arango Jimenez ^c,
 Darena Z. Morales Vera ^c, Juliana Velosa Porras ^a, Catalina Latorre Uriza ^{a,c},
 Francina M. Escobar Arregoces ^{a,c}, Patricia Hidalgo Martinez ^d, María E. Cortés ^e,
 Liliana Otero ^a, Claudia M. Parra Giraldo ^f, Nelly S. Roa Molina ^{a,**}

^a Centro de Investigaciones Odontológicas, Faculty of Dentistry, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

^b Department of Mathematics, Faculty of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

^c Periodontics, Faculty of Dentistry, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

^d Sleep Clinic, Hospital Universitario San Ignacio and Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

^e Faculty of Dentistry and Innovation Technology Graduate Program, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^f Human Proteomics and Mycoses Laboratory, Faculty of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia



ARTICLE INFO

Keywords:

Cytokines
 Saliva
 Gingival crevicular fluid
 Periodontitis
 Obstructive sleep apnea

ABSTRACT

Objective: This study aims to compare the salivary and gingival crevicular fluid (GCF) concentrations of five cytokines: IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-33, and Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in patients with OSA and their association with periodontitis.

Methods: Samples of saliva and GCF were obtained from 84 patients classified into four groups according to periodontal and OSA diagnosis: G1(H) healthy patients, G2(P) periodontitis and non-OSA patients, G3(OSA) OSA and non-periodontitis patients, and G4(P-OSA) periodontitis and OSA patients. The cytokines in the samples were quantified using multiplexed bead immunoassays. Data were analyzed with the Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparisons test, and the Spearman correlation test.

Results: Stage III periodontitis was the highest in patients with severe OSA (69%; $p=0.0142$). Similar levels of IL-1 β and IL-6 in saliva were noted in G2(P) and G4(P-OSA). The IL-6, IL-17A and IL-33 levels were higher in the GCF of G4(P-OSA). There was a significant positive correlation between IL-33 in saliva and stage IV periodontitis in G4(P-OSA) ($r_s = 0.531$). The cytokine profile of the patients in G4(P-OSA) with *Candida* spp. had an increase of the cytokine's levels compared to patients who did not have the yeast.

Conclusions: OSA may increase the risk of developing periodontitis due to increase of IL-1 β and IL-6 in saliva and IL-6, IL-17A and IL-33 in GCF that share the activation of the osteoclastogenesis. Those cytokines may be considered as biomarkers of OSA and periodontitis.

* Corresponding author. Centro de Investigaciones Odontológicas, Faculty of Dentistry, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

** Corresponding author.

E-mail addresses: tellezm@javeriana.edu.co (M.A. Téllez Corral), nelly.roa@javeriana.edu.co (N.S. Roa Molina).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14340>

Received 21 December 2022; Received in revised form 19 February 2023; Accepted 1 March 2023

Available online 14 March 2023

2405-8440/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Periodontitis is a chronic infectious disease caused mainly by strict anaerobic microorganisms [1] that cause an inflammatory response in periodontal tissue, developing periodontal pockets and progressive loss of periodontal insertion and destruction of teeth's supporting structure. These events may be a risk factor for systemic disorders such as cardiovascular disease [2], diabetes [3], rheumatic arthritis [4], and obstructive sleep apnea (OSA) [5,6]. OSA is characterized by the collapse of the upper airway during sleep, resulting in partial or complete obstruction of airflow [7]. OSA is the most common disturbance of sleep condition, with almost 1 billion people affected in the world, and with a prevalence exceeding 50% in some countries, like China, USA, Brazil and India. In Colombia, the prevalence of OSA is approximately 19–26% [8,9].

OSA is associated with a considerably higher risk of cardiovascular illness, such as high blood pressure, coronary heart disease, atrial fibrillation, stroke, diabetes, cancer and death, as well as a severe deterioration in the quality of life and functional capacity [10]. Moreover, OSA has also been associated with periodontitis. Studies in different countries determined that the prevalence of periodontitis is 60–96% in patients with OSA [5,11–14]. Sanders et al. (2015) found that Latin Americans with OSA have a higher risk of severe periodontitis than those without OSA [15]. Latorre et al. (2018) determined the clinical association between periodontitis and OSA in patients with hypertension [16].

The prevalence of periodontitis and OSA may be linked to systemic inflammation. Patients with OSA have higher levels of inflammatory cytokines, adhesion molecules, and activation of circulating neutrophils [17]. The chronic inflammation that underlies OSA might be linked to hypoxia and elevated CO₂ levels [18], which could activate transcription factors like NF- κ B, promote the generation of cytokines, reactive oxidant species, and other systemic inflammatory mediators [11,19]. Serum and saliva cytokine levels have been evaluated as candidate biomarkers for the association between OSA and periodontal disease. The association of both conditions might increase the severity of disease by rising the levels of salivary IL-6 [18] and IL-33 [20], changing the composition of biofilm microorganisms, particularly in patients with moderate or severe OSA [21,22]. IL-6 levels in the gingival crevicular fluid (GCF) of OSA patients have not been reported. Other cytokines with pro-osteoclastogenic effects, such as IL-17, may also contribute to the pathogenesis of periodontitis and other diseases [23], but their role in the relationship between periodontitis and OSA has not been investigated. Furthermore, higher IL-1 β levels in GCF and similar levels of TNF- α have been demonstrated in patients with OSA and periodontitis [5,18]. Although proinflammatory cytokine concentrations in OSA patients have been documented, some published saliva and serum results are inconsistent. Additionally, there are no studies comparing the levels of cytokines in saliva and GCF in individuals with periodontitis and OSA, to individuals who only have periodontitis or OSA, therefore it is unknown what function IL-17A plays in OSA patients.

Téllez et al. (2022) found that patients with OSA and periodontitis are associated with medical records and that the microorganisms of the orange and red complexes participate in this association [21]. The formation of the dysbiotic biofilm was mainly related to the presence of these complexes in association with *Candida* spp., and it could be related with the inflammation as a factor shared between OSA and periodontitis. Further, the pro-inflammatory cytokine levels are increased in serum, saliva and Gingival Crevicular Fluid (GCF) in patients with OSA due to their periodontal condition or indicating a bidirectional relationship between the two conditions, linking periodontitis with OSA. Since both periodontitis and OSA are associated with systemic inflammations possibly involving similar pathways, the objective of this study was to compare the expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-33, and TNF- α simultaneously in saliva and GCF in patients with OSA as biomarkers associated with the periodontal condition and its clinical status.

2. Materials and methods

2.1. Study population and samples

A convenience sample of 84 eligible patients that fulfilled the inclusion criteria (48 women and 36 men; aged between 30 and 71 years) were referred from the Sleep Clinic of the Hospital Universitario San Ignacio and the Sleep Clinic of the Faculty of Dentistry at the Pontificia Universidad Javeriana-PUJ, Bogotá, D.C., Colombia. The present study was carried out following the Declaration of Helsinki of 1975, revised in 2000, and approved by the Research and Ethics Committee of the Faculty of Dentistry (CIEFOUJ No. 005). Following the explanation of their conditions and before to the clinical evaluation, all patients gave written their informed consent. Oral samples (Saliva and GCF) from the patients were collected between May 2019 and March 2021.

The Sleep Clinic of the Hospital Universitario San Ignacio and the Sleep Clinic of the Faculty of Dentistry at the Pontificia Universidad Javeriana-PUJ, Bogotá, D.C., Colombia, referred a convenience sample of 84 eligible patients who fulfilled the inclusion criteria (48 women and 36 men; aged between 30 and 71 years). The current study was conducted in accordance to the Declaration of Helsinki of 1975, revised in 2000 and was given the go-ahead by the Faculty of Dentistry's Research and Ethics Committee (CIEFOUJ No. 005). All patients provided written informed permission following the description of their conditions and before to the clinical evaluation. Patients' oral samples (saliva and GCF) were taken between May 2019 and June 2019.

The following were the inclusion criteria: adults who were 30 years old; who had at least six teeth in their mouth; and had recently undergone a polysomnographic exam (no more than six months before). The following standards for exclusion were established: smokers; diabetics; patients who had recently taken antibiotics (in the previous three months); patients who had periodontal treatment previous periodontal treatment (in the last three months); patients who had been treated with continuous positive airway pressure (CPAP) or bilevel positive airway pressure (BPAP); patients who had a pharmacological or surgical treatment for OSA; patients with autoimmune disorders and acute respiratory conditions; and patients who were pregnant.

The presence and severity of OSA in the patients were determined by a polysomnographic study and the Apnea-Hypopnea Index (AHI: mean of apneas or hypopneas per hour). Thus, $5 < \text{AHI} < 15$ was considered mild OSA, $15 < \text{AHI} < 30$ was considered moderate OSA, and $\text{AHI} \geq 30$ was considered severe OSA [24]. For periodontal diagnosis all patients were examined at the Faculty of Dentistry-PUJ through clinic evaluation and panoramic X-rays and classified according to the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions [25].

In the dental records the patients' demographic and periodontal parameters were recorded, including age, sex, body mass index (BMI), probing depth (PD), clinical attachment loss (CAL), plaque index (PI), bleeding of probing (BOP), and medical records. According to the severity of OSA and periodontal diagnosis, the patients were classified into four groups: Group 1 (H) healthy patients ($n = 23$) – G1; Group 2 (P) periodontitis and non-OSA patients ($n = 17$) – G2; Group 3 (OSA) OSA and non-periodontitis patients ($n = 18$) – G3; and Group 4 (P-OSA) periodontitis and OSA patients ($n = 26$) – G4.

2.2. Oral samples collection

A 2-mL sample of unstimulated saliva collection was taken and stored at 4°C . Then samples were centrifuged for 20 min at 4°C at 10,000 rpm. The supernatant was collected and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®) was added before being stored at -20°C until processing. The GCF sample was taken by performing relative isolation of the tooth of interest with gauze and cotton rolls, as well as constant drying with cotton swabs to avoid saliva contamination. The sample was obtained from the deepest pocket in periodontitis patients and from any place in healthy patients by inserting standardized absorbent paper strips (Periopapers®, Oral Flow, Plainview, New York, USA) into the periodontal sulcus for 30 s. Bleeding-contaminated paper strips were discarded. The amount of GCF obtained was measured using Periotron 8010®, an electronic micro-moisture meter instrument (Ora Flow R Inc., New York, USA) (volume measure: periotron units), and the paper strips were immediately placed into 1.5 mL tubes containing 200 μL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich®). The GCF was vortexed for 10 s before being centrifuged at 2000 rpm for 5 min at 4°C . The supernatants were then frozen at -20°C until use [26,27].

2.3. Analysis of salivary and GCF cytokines

The levels of IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-33, and TNF- α were measured in 50 μL of saliva and GCF using multiplex bead immunoassays (Luminex® Multiplex Assays - Immunoassays, Austin, Texas, USA) according to the manufacturer's instructions (Milliplex MAP Humano TH17, Millipore, Cat. No. HTH17MAG-14 K) and quantification was done in the MAGPIX equipment (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA). The standard calibration curve, Software Luminex IS2.3 and Software xPONENT 3.1 (Austin, Texas, USA) were used to determine the concentrations of each cytokine (pg/mL).

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed with statistical software GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software, California, USA), XLSTAT statistical and data analysis solution (Addinsoft, New York, USA) and Software R 4.01 license GPNU (Free Software Foundation, Boston, USA). A descriptive analysis using means, medians, and interquartile ranges, as well as a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, were used to analyze the demographic variables, periodontal parameters of the patients, and cytokine concentrations. The non-parametric Kruskal-Wallis test and the Dunn test for multiple comparisons were used to evaluate the quantitative values of cytokines and the differences among groups (GraphPad Prism 9.0.2). Spearman r rank correlation test was used to determine the correlation between periodontal parameters and cytokine concentrations in saliva and GCF (XLSTAT). All tests were performed with p -value < 0.05 as significance level.

Table 1
Demographic variables and periodontal parameters of the patients.

Clinical variable	Group 1 (H) (n=23)	Group 2 (P) (n=17)	Group 3 (OSA) (n=18)	Group 4 (P-OSA) (n=32)
Age (years)	45 \pm 13	41 \pm 10	51 \pm 13	50 \pm 11
Sex (Females/Males) (n)	16/7	10/7	12/6	11/21
Teeth present	26 \pm 4	27 \pm 2	24 \pm 6	26 \pm 6
PD (mm)	1.79 \pm 0.47	2.6 \pm 0.43	2.57 \pm 4.77	13.12 \pm 9.71 ^{a,b,c}
Sites (%) PD \geq 4 mm	0.27 \pm 0.47	15.45 \pm 9.94 ^a	2.01 \pm 0.15 ^b	13.12 \pm 9.71 ^{a,c}
CAL (mm)	1.33 \pm 0.73	2.10 \pm 0.99	1.52 \pm 0.95	2.18 \pm 1.04
BOP (%)	12.04 \pm 11.86	51.31 \pm 26.35 ^a	25.16 \pm 22.78 ^{a,b}	48.07 \pm 25.39 ^{a,c}
PI	19.93 \pm 12.06	45.24 \pm 25.95 ^a	38.63 \pm 21.23 ^a	39.25 \pm 18.59 ^a
BMI (kg/m ²)	25.65 \pm 3.38	24.86 \pm 3.74	26.18 \pm 4.54	28.45 \pm 4.09

Values are given as mean \pm standard deviation.

PD: probing depth; CAL: clinical attachment loss; PI: plaque index; BOP: bleeding of probing; BMI: body mass index.

The statistical analysis was performed with Two-way ANOVA. Tukey's multiple comparisons test. $p < 0.05$.

^a Significantly different from Group 1.

^b Significantly different from Group 2.

^c Significantly different from Group 3.

3. Results

3.1. Demographic data and clinical periodontal parameters

The demographic variables and periodontal parameters of the study population are displayed in Table 1. There was a higher frequency of men in G4(P-OSA) than in the other groups. The probing depth - PD (mm) was significantly higher in G4(P-OSA) compared with the other groups ($p = 0.0049$). Furthermore, sites (%) PD ≥ 4 mm and BOP (%) showed statistically significant differences between G2(P) and G4(P-OSA) ($p < 0.001$) vs. G1(H).

It was found that 31% of individuals with mild OSA had periodontitis, 77% of individuals with moderate OSA had periodontitis, and 75% with severe OSA had periodontitis. The stage III periodontitis was statistically significant with severe OSA ($p = 0.0142$) (Fig. 1).

3.2. Cytokines concentration in saliva and GCF

Salivary IL-1 β was the highest of all in G4 (P-OSA) with a slight significance ($p = 0.057$), and there were no significant differences in GCF IL-1 β . Salivary IL-6 was significantly highest in G2 (P) ($p = 0.0044$), with differences between G1 (H) ($p = 0.026$) and G3(OSA) ($p = 0.0168$). There was no significant difference with G4 (P-OSA). In addition, salivary TNF- α was highest in G2 (P) ($p < 0.0001$), with differences with G3 (OSA) and G4 (P-OSA) ($p = 0.0004$ and $p = 0.0009$, respectively). In GCF, G3 (OSA) and G4 (P-OSA) had the greatest IL-6 levels; GCF IL-17A was highest in G3 (OSA) patients while GCF IL-33 was elevated in G4 (P-OSA) patients, but with no statistically significant differences. In GCF, patients of G2 (P) and G4 (P-OSA) exhibited similar levels of salivary IL-1 β ; IL-1 β level was higher in G2 (P), followed by G3 (OSA). Similarly, levels of salivary IL-6 were higher in G2(P) and G4(P-OSA), whereas levels of GCF IL-6 were higher in G3 (OSA) and G4 (P-OSA) (Table 2).

No concentrations of IL-17A were detected in saliva; however, GCF IL-17A levels were higher in G3 (OSA) and G4 (P-OSA). Salivary IL-33 levels were lower in all groups of patients, but G4 (P-OSA), followed by G3 (OSA) exhibited higher levels in GCF. Similarly, salivary TNF- α levels were lower in all groups of patients; however, G1 (H) and G3 (OSA) exhibited higher TNF- α levels, whereas G2 (P) and G4 (P-OSA) exhibited lower levels. There was a statistically significant difference in IL-6 and IL-33 concentrations between GCF and salivary cytokines being more evident in GCF (Fig. 2).

3.3. The tendency of the cytokine concentrations in each group of patients

The percentile plots indicate the tendency of the cytokine concentrations (pg/mL) in each group of patients evaluated. Higher salivary concentrations of IL-1 β , IL-6, and TNF- α (62, 5, and 1.4 pg/mL, respectively) were detected in 80% of patients of G2 (P).

Regarding GCF, 80% of patients of G4 (P-OSA) showed the highest concentration of IL-1 β (>100 pg/mL). Also, highest concentrations of IL-6 (27 pg/mL), IL-17A (50 pg/mL) and IL-33 (40 pg/mL) were detected in 80% of patients of G3 (OSA), followed by G4 (P-OSA): IL-6 (27 pg/mL), IL-17A (49 pg/mL) and IL-33 (38 pg/mL). A higher concentration of TNF- α was detected in 80% of patients of G3 (OSA) and G4 (P-OSA) (34 pg/mL) (Fig. 3).

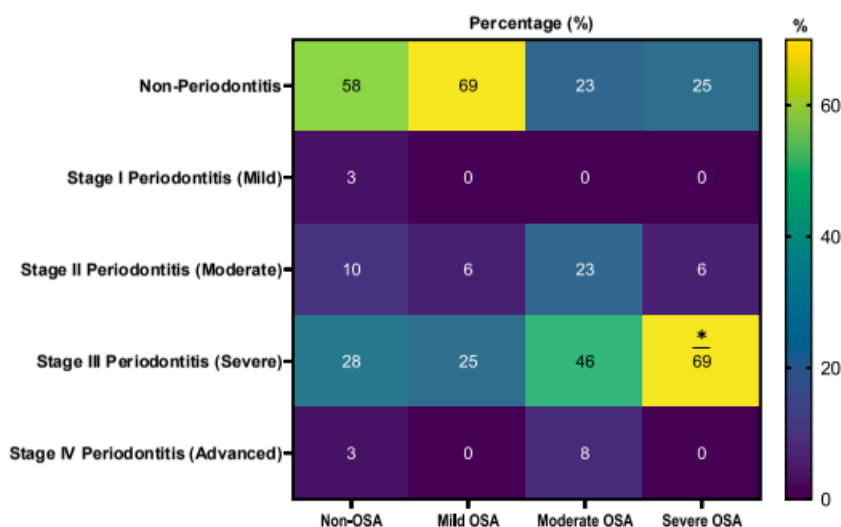


Fig. 1. Percentage of the periodontal condition of the patients according to apnea diagnosis; Two-way ANOVA. * p -value = 0.0142.

Table 2
Descriptive statistics of cytokines concentration in saliva and GCF.

Cytokines (pg/mL)	Sample	Group 1 (H) (n = 23)			Group 2 (P) (n = 17)			Group 3 (OSA) (n = 18)			Group 4 (P-OSA) (n = 26)			p-value
		Mean	Median	Range	Mean	Median	Range	Mean	Median	Range	Mean	Median	Range	
IL-1β	Saliva	24.28	9.93	0-238.7	36.87	18.46	0-159.2	24.82	12.25	0.39-159.2	52.97	19.45	0-816.6	0.057
	GCF	52.71	30.40	7.1-290.9	72.13	32.1	0-555.8	36.22	32.60	4.9-128.4	83.79	22.10	4.8-568.3	0.84
IL-6	Saliva	1.17	0.00	0-7.98	3.85	2.78^{a,b}	0-15.82	3.81	0.00	0-29.72	1.60	1.35	0-7.21	0.0044
	GCF	20.2	17.2	6.49-55.93	15.44	11.72	6.13-33.07	26.9	24.49	6.53-73.83	26.54	24.45	6.59-53.19	0.156
IL-17A	Saliva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-33	GCF	35.22	27.99	14.82-110.7	28.44	22.41	11.77-69.53	42.39	32.31	11.86-149.3	36.89	27.06	13.72-92.03	0.1128
	Saliva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF-a	GCF	29.85	26.18	9.47-81.96	21.77	15.53	9.95-47.91	39.93	36.4	10.06-114	37.56	37.71	10.16-73.07	0.071
	Saliva	1.42	1.23	0.59-2.65	1.37	1.47^{b,c}	0.57-2.12	1.19	0.54	0-6.57	0.84	0.26	0-5.45	<0.0001
	GCF	19.09	14.36	0-74.33	11.46	9.03	0-45.40	21.52	12.60	0-98.11	16.56	5.98	0-64.11	0.3957
	Saliva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

The statistical analysis was performed with the Kruskal-Wallis test and *post hoc* test: Multiple comparisons using Dunn's multiple comparisons per cytokine were compared between groups.

† Significantly different from Group 2.

^a Significantly different from Group 1.

^b Significantly different from Group 3.

^c Significantly different from Group 4.

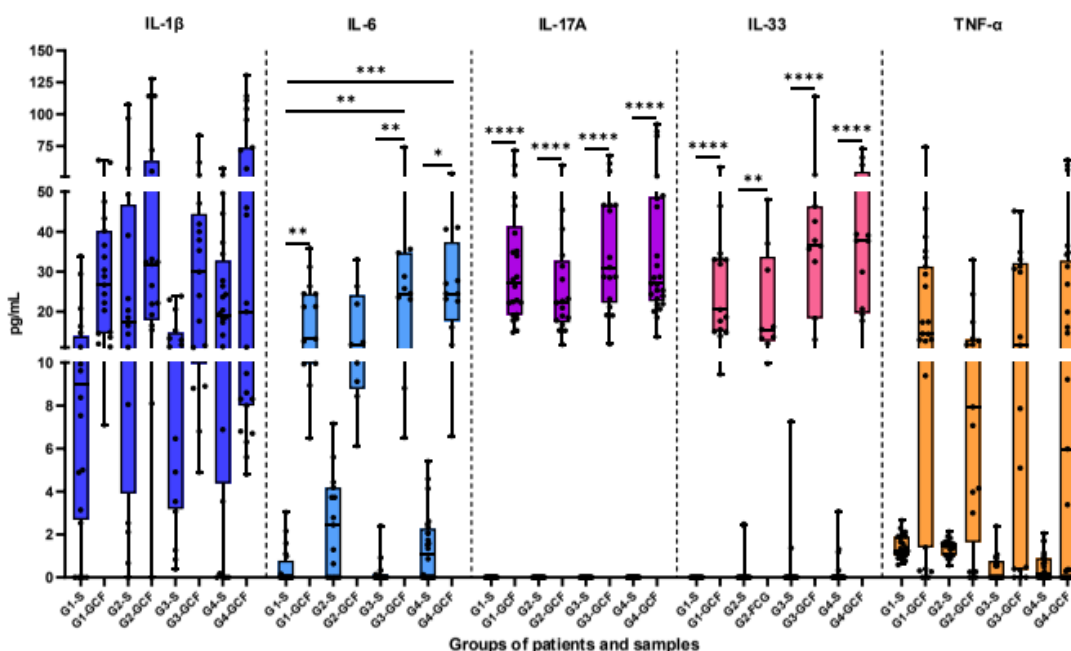


Fig. 2. Salivary and GCF concentrations of cytokines in the study groups and samples. Box and whiskers plots represent the median and minimum–maximum values, horizontal bars indicate the significant differences between groups. G1: Group 1 (H); G2: Group 2 (P); G3: Group 3 (OSA); G4: Group 4 (P-OSA). Saliva: S; Gingival Crevicular Fluid: GCF. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test: * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001; **** p -value < 0.0001.

3.4. Correlations of periodontal parameters and cytokine concentrations in saliva and GCF

There were significant positive correlations of periodontal parameters and cytokine concentrations in saliva between PI and IL-6 in G3 (OSA) ($r_s = 0.675$), PD and TNF- α in G1 (H) ($r_s = 0.572$), and a significant negative correlation between BOP (%) and TNF- α in G3 (OSA) ($r_s = -0.543$). Significant negative correlations between periodontal parameters and cytokine concentrations in GCF were found between PI and IL-6 ($r_s = -0.549$) and PI and IL-33 in G1 (H) ($r_s = -0.556$) and between all periodontal parameters and IL-6, IL-17A, IL-33 and TNF- α in G2 (P). Positive correlations between IL-1 β and all the periodontal parameters were found only in G2 (P), whereas positive correlations between IL-6, IL-17A, IL-33, TNF- α and periodontal parameters PD and BOP (%) were found in G3 (OSA) and G4 (P-OSA) in GCF and saliva (Table 3). Furthermore, Fig. S1 shows graphically the linear positive association ($p < 0.05$), how cytokines change in saliva and GCF in each group of patients, and how they correlate with each other (Fig. S1).

4. Cytokines levels in saliva and GCF, periodontal disease stage and severity of OSA

Periodontal disease stages and severity of OSA were related with the cytokines levels in G2 (P), G3 (OSA) and G4 (P-OSA) (Table 4). There was a significant positive correlation between stage IV periodontitis and salivary IL-33 ($r_s = 0.531$) in G4 (P-OSA), and there was a significant negative correlation between stage II periodontitis and GCF IL-1 β ($r_s = -0.510$, $p < 0.05$) in G2 (P). Moreover, there were only significant positive correlations between mild OSA and IL-1 β ($r_s = 0.516$), IL-6 ($r_s = 0.487$), IL-33 ($r_s = 0.487$), and TNF- α ($r_s = 0.539$) in GCF of G3 (OSA).

4.1. Concentrations of cytokines and presence of *Candida* spp. in oral microbiota

Based on the microbiological profiles of six G4 (P-OSA) patients, three of them positive for *Candida* spp. and three of them negative [21], the cytokine concentrations profile showed that the patients with *Candida* spp. had higher cytokine levels relative to those patients who did not have the yeast. In particular, all cytokines concentrations in GCF were the highest (>40 pg/mL), and only IL-1 β in saliva was higher in one patient (>60 pg/mL). Regarding to the patients without *Candida* spp., the cytokine concentration profiles were similar in the three patients, with higher levels of cytokines in GCF (20–50 pg/mL) (Fig. 4).

5. Discussion

To elucidate the association between OSA and periodontitis, this study compared the salivary and gingival crevicular fluid (GCF) concentrations of five pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-33, and TNF- α) in patients with and without OSA and their association with periodontal condition. The present study demonstrated a high prevalence of stage III periodontitis in patients with

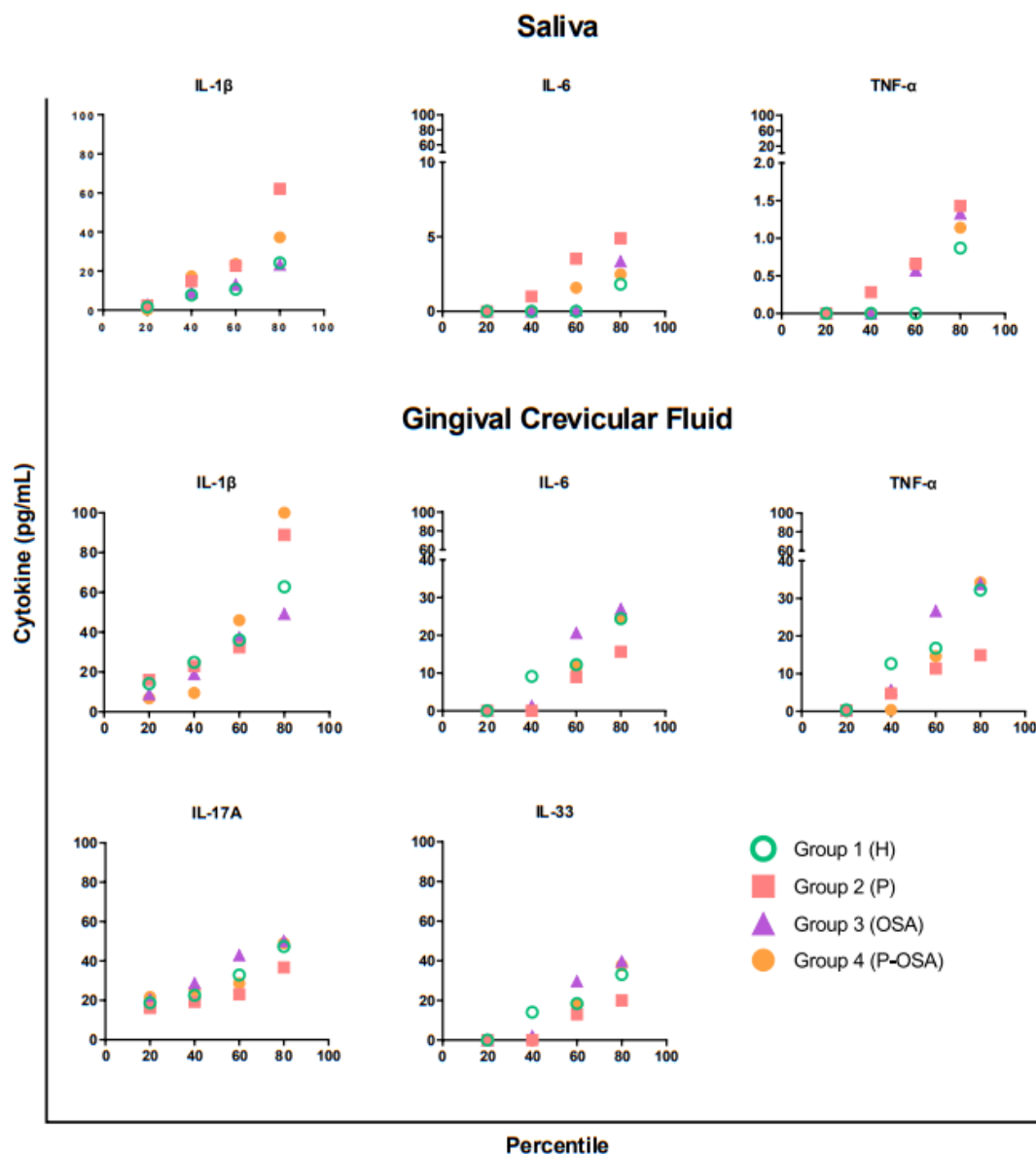


Fig. 3. Percentile graph of the cytokine concentrations in saliva and GCF in each group of patients evaluated. Each point represents the cytokine concentration in all patients of each group. The x-axis represents the percentiles and the y-axis the cytokine concentrations in pg/mL. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

severe OSA (69%, $p = 0.0142$). This result is comparable to what Gamsiz-Isik et al. reported (2017) [5], who demonstrated a higher prevalence of severe periodontitis in patients with OSA (48.2%, $p < 0.001$), with moderate-to-severe OSA being more prevalent (52.2%), similarly to results reported by Seo et al. (2013) [12] who determined that 60% of patients with periodontitis had OSA, and Stazić et al. (2022) [28] who concluded that patients with moderate-to-severe OSA had more severe stages of periodontitis (stages III and IV) ($p = 0.043$).

Moreover, in the present study, PD (>4 mm) and BOP (%) were significantly increased in patients with OSA (G3) compared to healthy patients (G1), as reported by Seo et al. (2013) [12] who determined that PD (≥ 4 mm; $p < 0.005$) and CAL (≥ 6 mm; $p < 0.008$) were significantly higher in patients with OSA. This evidence suggests that the OSA condition and its physiopathology might be a risk factor for the progression of periodontitis.

Furthermore, different studies have evaluated the immunological relationship between periodontitis and OSA, determining the levels of pro-inflammatory cytokines in saliva, GCF and serum [5,18,20]. As well as the present study, Nizam et al. (2014) reported no statistically significant difference in salivary IL-1 β concentrations between a group of healthy patients and a group of patients with OSA [20]. However, our study found high concentrations of IL-1 β in saliva ($p = 0.057$) from G2 (P) and G4 (P-OSA) compared to G1 (H) and found that 80% of patients of both groups had the highest concentration of IL-1 β (40–60 pg/mL), a determinant cytokine in

Table 3
Correlations (r_s) of periodontal parameters and cytokines concentrations.

Periodontal parameter/ cytokine	Sample	IL-1 β				IL-6				IL-17A				IL-33				TNF- α			
		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Sites (%) PD >4 mm	Saliva	0.028	0.446	-0.081	0.095	-0.141	-0.102	0.232	0.042	-	-	-	-	-	-0.280	0.304	-0.030	0.353	0.156	-0.261	-0.030
	GCF	0.012	0.706	-0.102	-0.164	-0.058	-0.633	-0.096	0.073	-0.134	-0.340	0.010	-0.037	-0.090	-0.637	-0.116	0.083	0.018	-0.588	-0.135	0.033
PD (mm)	Saliva	0.316	0.210	-0.097	0.198	0.222	-0.078	-0.189	0.048	-	-	-	-	-	0.061	-0.066	-0.184	0.572	0.066	-0.264	-0.184
	GCF	0.064	0.807	0.254	-0.103	0.069	-0.485	0.357	0.231	0.066	-0.452	0.296	0.100	-0.009	-0.548	0.355	0.238	0.096	-0.542	0.244	0.214
CAL (mm)	Saliva	0.240	0.373	-0.207	0.233	-0.215	-0.084	0.11	0.194	-	-	-	-	-	-0.048	0.081	0.129	0.302	0.211	0.180	0.129
	GCF	0.165	0.689	-0.137	-0.019	0.048	-0.624	-0.269	0.072	-0.195	-0.345	-0.063	-0.052	0.017	-0.622	-0.28	0.070	0.017	-0.510	-0.193	0.135
BOP (%)	Saliva	0.177	0.196	-0.434	0.142	0.105	0.194	0.337	-0.032	-	-	-	-	-	0.140	0.242	0.166	0.337	0.020	-0.543	0.166
	GCF	0.100	0.620	0.133	0.095	0.052	-0.492	0.024	0.233	0.185	-0.274	0.27	0.076	0.008	-0.551	0.031	0.232	0.092	-0.492	0.019	0.200
PI	Saliva	-0.032	0.282	0.030	-0.029	-0.024	-0.226	0.675	0.366	-	-	-	-	-	-0.088	0.147	0.198	0.257	0.077	0.109	0.198
	GCF	0.086	0.417	-0.319	-0.287	-0.549	-0.720	-0.401	-0.189	-0.087	-0.382	-0.128	-0.162	-0.556	-0.698	-0.388	-0.201	-0.411	-0.659	-0.398	-0.191
IL-1 β	Saliva	-	-	-	-	0.572	0.494	-0.018	0.102	-	-	-	-	-	-0.271	-0.399	0.095	0.656	0.568	0.380	0.095
	GCF	-	-	-	-	0.278	-0.002	0.83	0.637	0.352	-0.450	0.534	0.128	0.242	-0.109	0.832	0.637	0.322	-0.022	0.795	0.598
IL-6	Saliva	0.572	0.494	-0.018	0.102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.182	0.454	0.583	0.288	0.198	0.243	0.583
	GCF	0.278	0.804	0.830	0.637	-	-	-	-	0.783	-0.173	0.745	0.548	0.984	0.915	0.998	0.998	0.951	0.804	0.966	0.947
IL-17A	Saliva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GCF	0.352	0.510	0.534	0.128	0.783	-0.173	0.745	0.548	-	-	-	-	0.774	-0.181	0.741	0.556	0.834	-0.041	0.773	0.569
IL-33	Saliva	-	-0.271	-0.399	-0.189	-	0.182	0.454	0.439	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.310	0.335	0.400
	GCF	0.242	0.754	0.832	0.637	0.984	0.915	0.998	0.998	0.774	-0.181	0.741	0.556	-	-	-	-	0.937	0.796	0.964	0.950
TNF- α	Saliva	0.656	0.568	0.380	0.095	0.288	0.198	0.243	0.583	-	-	-	-	-	0.310	0.335	0.400	-	-	-	-
	GCF	0.322	0.795	0.795	0.598	0.951	0.804	0.966	0.947	0.834	-0.041	0.773	0.569	0.937	0.796	0.964	0.95	-	-	-	-

Coefficient values in bold are significant at a 0.05 significance level. Spearman rank correlation (r_s). The blue tones represent a positive correlation and the red tones represent a negative correlation. G1: Group 1 (H). n=23; G2: Group 2 (P). n=17; G3: Group 3 (OSA). n=18; G4: Group 4 (P-OSA). n=26. PD: probing depth; CAL: clinical attachment loss; BOP: bleeding of probing; PI: plaque index.

Table 4
Correlations (r_s) between cytokines levels in saliva and GCF vs. periodontal disease status and grade of OSA.

Cytokines	Group of patients	Periodontal diagnosis				Group of patients	OSA diagnosis		
		Stage I periodontitis	Stage II periodontitis	Stage III periodontitis	Stage IV periodontitis		Mild OSA	Moderate OSA	Severe OSA
IL-1 β (Saliva)	G2	0.306	-0.425	0.025	0.408	G3	0.297	-0.187	-0.18
	G4	-	-0.267	0.268	-0.04	G4	-0.039	-0.265	0.283
IL-6 (Saliva)	G2	0.413	-0.401	0.178	-0.052	G3	-0.398	0.095	0.382
	G4	-	0.08	-0.207	0.288	G4	0.047	0.361	-0.381
IL-33 (Saliva)	G2	-0.091	-0.202	0.269	-0.091	G3	-0.442	0.289	0.259
	G4	-	0.031	-0.271	0.531	G4	0.052	0.369	-0.393
TNF- α (Saliva)	G2	0	-0.229	0.102	0.207	G3	-0.082	-0.046	0.138
	G4	-	-0.074	-0.063	0.288	G4	0.201	0.044	-0.201
IL-1 β (GCF)	G2	-0.102	-0.51	0.477	0.051	G3	0.516	-0.359	-0.283
	G4	-	-0.137	0.231	-0.227	G4	0.28	-0.221	-0.01
IL-6 (GCF)	G2	0.054	-0.194	0.013	0.269	G3	0.487	-0.133	-0.451
	G4	-	-0.021	0.104	-0.185	G4	0.076	0.052	-0.11
IL-17 (GCF)	G2	-0.204	-0.142	0.05	0.357	G3	0.319	-0.072	-0.309
	G4	-	0.332	-0.341	0.067	G4	0.033	0.113	-0.134
IL-33 (GCF)	G2	0.162	-0.194	-0.04	0.269	G3	0.487	-0.133	-0.451
	G4	-	-0.007	0.091	-0.185	G4	0.104	0.029	-0.11
TNF- α (GCF)	G2	0.051	-0.297	0.113	0.255	G3	0.539	-0.245	-0.413
	G4	-	-0.026	0.062	-0.081	G4	0.132	0.049	-0.151

Coefficient values in bold are significant at a 0.05 significance level. The red tones represent a negative correlation and the blue tones represent a positive correlation. Spearman's rank correlation coefficient (r_s). G1: Group 1 (H). n=23; G2: Group 2 (P). n=17; G3: Group 3 (OSA). n=18; G4: Group 4 (P-OSA). n=26

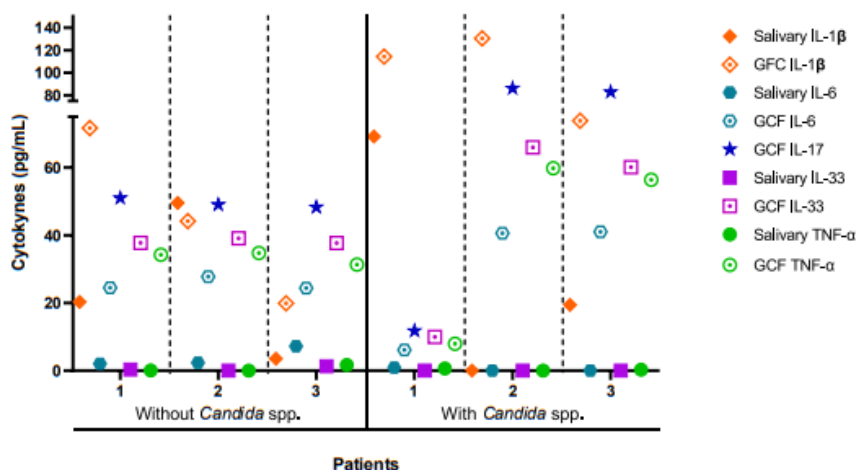


Fig. 4. Cytokine concentrations in saliva and GCF in three patients without *Candida* spp. and three patients with *Candida* spp. These patients were classified in the G4 (P-OSA).

periodontitis. Although there were no significant differences between the concentrations of IL-1 β from G2 (P) and G4 (P-OSA), there was a high level of this cytokine in patients with periodontitis and OSA (G4, P-OSA), suggesting a relationship between OSA and periodontitis.

Similarly, the salivary IL-6 was highest in G2 (P) and G4 (P-OSA), as reported by Nizam et al. (2014, 2016) in patients with OSA, and its concentration was statistically significant in G2 (P) [18,20]. On the other hand, a positive correlation was observed between salivary IL-6 and PI ($r_s = 0.675; p < 0.05$) in G3 (OSA), and BOP (%) and PI in G4 (P-OSA), which may be explained by the existence of a biofilm in these individuals that increases IL-6 levels as well as the risk of inducing a local inflammatory response; thus, IL-6 could serve as an early salivary biomarker of periodontitis associated to OSA.

Otherwise, the IL-6 in GCF was higher in patients of the G3 (OSA) and G4 (P-OSA) and positively correlated with PD in G3 (OSA) and with PD and BOP (%) in G4 (P-OSA), in comparison with G2 (P) which had lower levels and negative correlations with all periodontal parameters. Our finding of a high concentration of IL-6 in GCF from patients with OSA and periodontitis has not been reported before in literature. Regarding IL-1 β in GCF, a possible explanation for the local inflammation is that dryness of mouth caused by OSA, leads to a bacterial colonization as reported by Gamsiz-Isik et al. (2017) [5].

In addition, the present study reports for the first time that concentrations of IL-17A in GCF were high in patients with OSA (G3) and (P-OSA) (G4), with a positive correlation in PD (mm) and BOP (%) in both groups. The IL-17A is secreted by resident memory T helper 17 cells (TH17 cells), which have a homeostatic oral accumulation in presence of IL-6. However, the periodontitis-associated TH17 cells proliferation requires of IL-6 and IL-23 [29] to increase the production of IL-17A. This cytokine has potent osteoclastogenic and inflammatory bone destruction properties due to its capacity to stimulate the expression of RANKL in osteoblasts because it mediates the destruction of connective tissue by inducing the expression of matrix metalloproteinases -3, -9 and -13 (MMP-3, 9, 13) in fibroblasts [30].

Furthermore, there are studies that have shown a significant increase of IL-23 levels in serum of patients with OSA, and its positive correlation with AHI and C-reactive protein (CRP) [31,32], suggesting that high levels of IL-23 in patients with OSA can stimulate the production of pro-inflammatory cytokines by TH17 cells, like IL-17A, which is involved in the development of periodontitis [29].

The present study found lower concentrations of IL-33 in saliva in all groups of patients, while Nizam et al. (2014) found that the concentrations of IL-33 in saliva were higher in patients with OSA, regardless of the severity of the OSA [20]. However, the levels of IL-33 in GCF in the present study were higher in patients from G3 (OSA) and G4 (P-OSA) with positive correlations with periodontal parameters in PD in G3 (OSA) and PD and BOP (%) in G4 (P-OSA). In periodontitis, the expression of IL-33 in gingival epithelial and connective tissue cells acts as an alarmin of tissue damage for the immune system, inducing RANKL expression and triggering the recruitment of RANKL-expressing B and T cells [33,34]. Sozer et al. (2018) reported serum IL-33 concentrations significantly higher in patients with OSA, and hypothesized that OSA influences the levels of IL-33 and is involved in the systemic inflammation produced in OSA [35]. Nizam et al. (2014) have also shown high levels of IL-33 in saliva of patients with OSA [20]. These findings may help explain the bidirectional relationship between periodontitis and OSA, which results from their comorbidity, where the presence of one may cause the other to become more inflammatory. Both conditions increase the presence of IL-17A and IL-33 that share the activation of osteoclastogenesis mediated by RANKL/OPG axis that cause periodontal bone resorption [36,37].

Interestingly, TNF- α plays both anti-inflammatory and pro-inflammatory roles in inflammation: initiating a strong inflammatory response and regulating the intensity and duration of inflammatory processes, respectively. This cytokine plays a variety of roles in the development of periodontitis, including attracting cells to sites of tissue damage and inflammation, and promoting the breakdown of extracellular matrix and bone resorption by increasing the production of IL-1 β , IL-6, collagenases, MMPs, and RANKL in gingival epithelial cells [33]. TNF- α levels in saliva and serum were not significantly different between patients with periodontitis and healthy patients; in fact, TNF- α levels were lower in periodontitis patients.

Regarding the levels of TNF- α in OSA, earlier investigations found that both OSA patients and healthy individuals had the same amounts of TNF- α in GCF [5], saliva [18], and plasma [32]. In contrast, other research found a strong relationship between TNF- α and indicators of the severity of OSA and oxygen desaturation [38] among recently diagnosed OSA patients [39]. According to the current findings, with the exception of individuals who only had periodontitis (G2), the patients with OSA and periodontitis and OSA had similarly low levels of TNF- α in saliva. In contrast, the levels of TNF- α in GCF were higher in healthy patients in comparison to patients with OSA and with both conditions. Given the dual functions of TNF- α as an inflammatory mediator, these findings show that there is still a discrepancy in the determination of the levels of TNF- α in patients with periodontitis associated with OSA. This discrepancy may be explained by variations in the demographic and clinical characteristics of the individuals. Therefore, further investigations are required to establish a link between TNF- α levels in saliva, GCF, serum and periodontal condition in OSA assessed simultaneously in the same patients.

According to the correlations of periodontal parameters and cytokine concentrations in saliva and GCF, there was a positive correlation between PD and salivary TNF- α in G1 (H) ($r_s = 0.572$; $p < 0.05$). TNF- α may be acting as an anti-inflammatory cytokine in the homeostatic process in healthy individuals.

The anti-inflammatory function of TNF- α in patients without periodontitis may also explain the negative correlation between BOP (%) and TNF- α in G3 (OSA) ($r_s = -0.543$; $p < 0.05$). Furthermore, there was a negative correlation between PI and GCF IL-6 ($r_s = -0.549$; $p < 0.05$) and between PI and GCF IL-33 in G1 (H) ($r_s = -0.556$; $p < 0.05$). These findings might support the homeostatic function of IL-6, although it is unclear whether IL-33 works on the same principle in healthy individuals. Nevertheless, it is important to emphasize the positive correlation between levels of IL-33 and the other cytokines analyzed in patients with OSA and individuals who also have periodontitis, and in the same way, the positive correlation between salivary IL-33 with stage IV periodontitis and moderate OSA in G4 (P-OSA). Further research is necessary to support the role of IL-33 in the physiopathology of OSA in patients with periodontitis.

Despite some authors still concluding that there is little evidence of a possible relationship between periodontitis and OSA, both cause-and-effect and their pathophysiological mechanisms [40], other studies have proposed different mechanisms involving genetic, microbiological, and immunological factors as possible cause-and-effect relationships between OSA and periodontitis [6,18,21,22,41,42]. Both conditions, periodontitis and OSA, may be related by systemic inflammation. Patients with OSA exhibit an increased proliferative potential of natural killer (NK) and CD4 T cells and a decreased capacity of neutrophils to phagocytose bacteria and produce ROS [43,44]. Even the levels of the other enzymes released by neutrophils during inflammation, such as matrix metalloproteinases (MMPs), are significantly lower in patients with severe OSA [44]. Hypoxia and hypercapnia present in patients with OSA have been shown to be related to the apoptosis of periodontal cells [45], that may increase the production of pro-inflammatory cytokines and stimulate transcription factors such as the nuclear transcription factor (NF- κ B) [46]; this factor is involved in the periodontal bone loss [47,48] mediated by the increase of RANKL/OPG (Receptor activator of NF- κ B ligand/Osteoprotegerin) axis ratio that activates the osteoclastogenic process [37].

Additionally, the presence of *Candida* spp. in the oral microbiota of patients with periodontitis and OSA [21] might well be responsible for the high levels of IL-17A and IL-33 in GCF, worsening periodontal disease. Previous studies have reported the role of IL-17A and IL-33 in response to systemic *Candida albicans* infections, promoting antifungal immunity [49,50]; however, other authors have described the pro-inflammatory function of these cytokines, demonstrating how IL-33 stimulates the production of other cytokines like IL-1 and IL-6 [51], and how the presence of a dysbiotic microbiota causes an increase in IL-17A, which in turn triggers the osteoclastogenic process [52].

In spite of using sensitive multiplex bead immunoassays, the present study faced a limitation in determining values smaller than 5 pg/mL of IL-17A and IL-33 in saliva. Also, comparisons between the two sexes are not possible using the data from this study; hence it is advised to do additional research in the future with a larger sample size and age- and sex-stratified analyses. Analyses based on oxygen saturation and microarousals based on the severity of OSA should also be included. However, the findings of the present study suggest that periodontitis and OSA have a bidirectional-relationship: OSA may increase the risk of developing periodontitis, and periodontitis worsens the inflammatory process in OSA. The pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-33 and IL-17A can be proposed as biomarkers of both conditions in GCF due to their ability to trigger the activation of osteoclastogenesis in periodontitis (Fig. S2).

6. Conclusions

The present study suggests a bidirectional and comorbid link between OSA and periodontitis. There was a higher prevalence of stage III periodontitis and severe OSA, as well as higher levels of periodontal parameters (PI and BOP), and expression of IL-1 β and IL-6 in saliva and IL-6, IL-17A, and IL-33 in GCF, in patients with periodontitis and OSA. These cytokines may be considered biomarkers of both conditions, emphasizing the association between IL-33 and stage IV periodontitis.

Our results suggest that there is a potential diagnosis of association between individuals with OSA and periodontitis; individuals with OSA should get a periodontal screening; and individuals with periodontitis should get a sleep study to determine OSA. Further studies are necessary to analyze the role of pro-inflammatory cytokines in the physiopathology of OSA in patients with periodontitis.

Declarations

Author contribution statement

Mayra A. Téllez Corral: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments, Analyzed and interpreted the data;

Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper. Eddy Herrera Daza; Juliana Velosa Porras; María E. Cortés; Liliانا Otero; Claudia M. Parra Giraldo; Nelly S. Roa Molina: Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data. Natalia Arango Jimenez; Darena Z. Morales Vera; Catalina Latorre-Uriza; Francina M. Escobar Arregoces; Patricia Hidalgo Martínez: Contributed reagents, Materials, analysis tools or data. Nelly S. Roa Molina: Conceived and designed the experiments.

Funding statement

Dr. Mayra Alexandra Téllez Corral was supported by Banco de la República [4.509].

Data availability statement

Data included in article/supp. material/referenced in article.

Declaration of interest's statement

The authors declare no competing interests.

Acknowledgment

We thank María Alejandra Cabrera of PAF (Purificación y Análisis de Fluidos S.A.S) and Jean Carlos Villamil of CIO-PUJ for their support and technical assistance. We are grateful to the Pontificia Universidad Javeriana for funding provided through the Professors' Training Agreement for Postgraduate Studies aimed to their doctoral training.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14340>.

References

- [1] S.C. Cortelli, J.R. Cortelli, R.L. Romeiro, et al., Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses, *Arch. Oral Biol.* 58 (2013) 67–74, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.09.004>.
- [2] F.Q. Bui, C.L.C. Almeida-da-Silva, B. Huynh, et al., Association between periodontal pathogens and systemic disease, *Biomed. J.* 42 (1) (2019) 27–35, <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>.
- [3] F. Escobar, C. Latorre, J. Velosa, et al., Relation between ultra-sensitive C-reactive protein, diabetes and periodontal disease in patients with and without myocardial infarction, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 58 (4) (2014) 362–368, <https://doi.org/10.1590/0004-2730000002899>.
- [4] F. Xiao, C. Li, Y. Lin, et al., Increased risk of periodontitis occurrence in patients with rheumatoid arthritis and its association with the levels of il-1 β and tnf- α in gingival crevicular fluid, *Ann. Palliat. Med.* 10 (8) (2021) 9078–9087, <https://doi.org/10.21037/apm-21-1782>.
- [5] H. Gamsiz-Isik, E. Kiyani, Z. Bingol, U. Baser, E. Ademoglu, F. Yalcin, Does obstructive sleep apnea increase the risk for periodontal disease? A case-control study, *J. Periodontol.* 88 (5) (2017) 443–449, <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160365>.
- [6] T.S. Al-Jewair, R. Al-Jasser, K. Almas, Periodontitis and obstructive sleep apnea's bidirectional relationship: a systematic review and meta-analysis, *Sleep Breath.* 19 (4) (2015) 1111–1120, <https://doi.org/10.1007/s11325-015-1160-8>.
- [7] B.W. Locke, J.J. Lee, K.M. Sundar, OSA and chronic respiratory disease: mechanisms and epidemiology, *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 19 (9) (2022), <https://doi.org/10.3390/ijerph19095473>.
- [8] A. Ruiz, M. Rendón, P. Hidalgo, et al., Prevalence of sleep complaints in Colombia at different altitudes, *Sleep Sci* 9 (2) (2016) 100–105, <https://doi.org/10.1016/J.SLSCI.2016.05.008>.
- [9] P. Hidalgo-Martínez, R. Lobelo, Epidemiología mundial, latinoamericana y colombiana y mortalidad del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS), *Rev. la Fac. Med.* 65 (1Sup) (2017) 17–20, <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v65n1Sup.59565>.
- [10] J.F. Garvey, M.F. Pengo, P. Drakatos, B.D. Kent, Epidemiological aspects of obstructive sleep apnea, *J. Thorac. Dis.* 7 (5) (2015) 920–929, <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.04.52>.
- [11] K. Gunaratnam, B. Taylor, B. Curtis, P. Cistulli, Obstructive sleep apnoea and periodontitis: a novel association? *Sleep Breath.* 13 (3) (2009) 233–239, <https://doi.org/10.1007/s11325-008-0244-0>.
- [12] W.H. Seo, E.R. Cho, R.J. Thomas, et al., The association between periodontitis and obstructive sleep apnea: a preliminary study, *J. Periodontol. Res.* 48 (4) (2013) 500–506, <https://doi.org/10.1111/jre.12032>.
- [13] NE ja Ahmad, A.E. Sanders, R. Sheats, J.L. Brame, G.K. Essick, Obstructive sleep apnea in association with periodontitis: a case-control study, *J. Dent. Hyg.* 87 (4) (2013) 188–199.
- [14] A. Cuervo, M.C. Martínez, G. Sosa, et al., Condición periodontal de pacientes con apnea obstructiva del sueño, *Univ. Odontológica*, 2016;33(June), pp. 1–34, <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo35-74.cppa>.
- [15] A.E. Sanders, G.K. Essick, J.D. Beck, et al., Periodontitis and sleep disordered breathing in the hispanic community health study/study of latinos, *Sleep* 38 (8) (2015) 1195–1203, <https://doi.org/10.5665/sleep.4890>.
- [16] C. Latorre, F. Escobar, J. Velosa, D. Rubiano, P. Hidalgo-Martínez, L. Otero, Association between obstructive sleep apnea and comorbidities with periodontal disease in adults, *J. Indian Soc. Periodontol.* 22 (3) (2018) 215–220, <https://doi.org/10.4103/jisp.jisp.38.18>.
- [17] Mohit, A. Shrivastava, P. Chand, Molecular determinants of obstructive sleep apnea, *Sleep Med.* 80 (2021) 105–112, <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2021.01.032>.
- [18] N. Nizam, M.S. Tasbakan, O.K. Basoglu, D.F. Lappin, N. Buduneli, Is there an association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal inflammation? *Clin. Oral Invest.* 20 (4) (2016) 659–668, <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1544-y>.

- [19] R.J. Kimoff, Q. Hamid, M. Divangahi, et al., Increased upper airway cytokines and oxidative stress in severe obstructive sleep apnoea, *Eur. Respir. J.* 38 (1) (2011) 89–97, <https://doi.org/10.1183/09031936.00048610>.
- [20] N. Nizam, O. Basoglu, M. Tasbakan, A. Nalbantsoy, N. Buduneli, Salivary cytokines and the association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease, *J. Periodontol.* 85 (7) (2014) e251–e258, <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130579>.
- [21] M.A. Téllez Corral, E. Herrera Daza, H.K. Cuervo Jimenez, et al., Patients with obstructive sleep apnea can favor the predisposing factors of periodontitis by the presence *P. melaninogenica* and *C. albicans*, increasing the severity of the periodontal disease, *Front. Cell. Infect. Microbiol. Sept* (2022) 1–15, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.934298>.
- [22] Y. Chen, X. Chen, X. Huang, Y. Duan, H. Gao, X. Gao, Analysis of salivary microbiome and its association with periodontitis in patients with obstructive sleep apnea, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2021);11(December) 1–11, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.752475>.
- [23] C. Zenobia, G. Hajishengallis, Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation, *Periodontol* 69 (1) (2015) 142–159, <https://doi.org/10.1111/prd.12083>, 2000.
- [24] M.J. Sateia, International classification of sleep disorders-third edition highlights and modifications, *Chest* 146 (5) (2014) 1387–1394, <https://doi.org/10.1378/chest.14-0970>.
- [25] J. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, et al., A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification, *J. Clin. Periodontol.* 45 (2018) S1–S8, <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>.
- [26] I. Tomás, N. Arias-Bujanda, M. Alonso-Sampedro, et al., Cytokine-based predictive Models to estimate the probability of chronic periodontitis: development of diagnostic nomograms, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1–15, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06674-2>.
- [27] A. Heboyan, A. Ul, Y. Syed, et al., Cytomorphometric analysis of inflammation Dynamics in the Periodontium following the use of fixed dental Prostheses, *Molecules* 25 (20) (2020) 4650.
- [28] P. Stazić, M. Roguljić, Z. Dogaš, et al., Periodontitis severity in obstructive sleep apnea patients, *Clin. Oral Invest.* 26 (1) (2022) 407–415, <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04012-5>.
- [29] N. Dutzan, T. Kajikawa, L. Abusleme, et al., A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans, *Sci. Transl. Med.* 10 (463) (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0797>.
- [30] G. Hajishengallis, J.M. Korostoff, Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later, *Periodontol* 75 (1) (2017) 116–151, <https://doi.org/10.1111/prd.12181>, 2000.
- [31] M. Can, B. Guven, Effect of continuous positive airway pressure (CPAP) therapy on IL-23 in patients with obstructive sleep apnea, *Immunol. Res.* 64 (2016) 1179–1184, <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8869-8>.
- [32] Y. Huang, C. Guilleminault, F. Hwang, et al., Inflammatory cytokines in pediatric obstructive sleep apnea, *Medicine (Baltim.)* 95 (41) (2016) 1–8.
- [33] N. Medara, J.C. Lenzo, K.A. Walsh, E.C. Reynolds, I.B. Darby, N.M. O'Brien-Simpson, A review of T helper 17 cell-related cytokines in serum and saliva in periodontitis, *Cytokine* 138 (November 2020) (2021), 155340, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155340>.
- [34] O. Lapérine, A. Cloitre, J. Caillon, et al., Interleukin-33 and RANK-L interplay in the alveolar bone loss associated to periodontitis, *PLoS One* 11 (12) (2016) 1–17, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168080>.
- [35] V. Sozer, M. Kutnu, E. Atahan, et al., Changes in inflammatory mediators as a result of intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome, *Clin. Res. J* 12 (4) (2018) 1615–1622, <https://doi.org/10.1111/crj.12718>.
- [36] V.A. Patil, M.H. Desai, Biology of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and Osteoprotegerin (OPG) in periodontal health and disease - a review, *People's J. Sci. Res.* 7 (1) (2014) 58–63.
- [37] K. Sirisereepap, T. Maelkawa, H. Tamura, et al., Osteoimmunology in periodontitis: local proteins and compounds to alleviate periodontitis, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (10) (2022) 1–19, <https://doi.org/10.3390/ijms23105540>.
- [38] K. Minoguchi, T. Tazaki, T. Yokoe, et al., Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome, *Chest* 126 (5) (2004) 1473–1479, <https://doi.org/10.1378/chest.126.5.1473>.
- [39] S.O. Wali, J. Al-Mughales, F. Alhejailli, et al., The utility of proinflammatory markers in patients with obstructive sleep apnea, *Sleep Breath.* 25 (2) (2021) 545–553, <https://doi.org/10.1007/s11325-020-02149-3>.
- [40] D. Lembo, F. Carocci, C. Lopes, F. Moscagiuri, B. Sinjari, M. D'Attilio, Obstructive sleep apnea and periodontal disease: a systematic review, *Med* 57 (6) (2021) 1–12, <https://doi.org/10.3390/medicina57060640>.
- [41] X. Zhang, S. Wang, H. Xu, H. Yi, J. Guan, S. Yin, Metabolomics and microbiome profiling as biomarkers in obstructive sleep apnoea: a comprehensive review, *Eur. Respir. Rev.* 30 (160) (2021) 200–220, <https://doi.org/10.1183/16000617.0220-2020>.
- [42] B.E. Cade, H. Chen, A.M. Stilp, et al., Genetic associations with obstructive sleep apnea traits in hispanic/latino Americans, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194 (7) (2016) 886–897, <https://doi.org/10.1164/rccm.201512-2431OC>.
- [43] E.A. Said, M.A. Al-Abri, I. Al-Saidi, et al., Altered blood cytokines, CD4 T cells, NK and neutrophils in patients with obstructive sleep apnea, *Immunol. Lett.* 190 (August) (2017) 272–278, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.009>.
- [44] N. Nizam, O.K. Basoglu, M.S. Tasbakan, A. Holtho, Do salivary and serum collagenases have a role in an association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease? A preliminary case – control study, *Arch. Oral Biol.* 60 (2015) 134–143, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.09.006>.
- [45] O. Karatas, H. Balci Yuce, F. Tulu, M.M. Taskan, F. Gevrek, H. Toket, Evaluation of apoptosis and hypoxia-related factors in gingival tissues of smoker and non-smoker periodontitis patients, *J. Periodontol. Res.* 55 (3) (2020) 392–399, <https://doi.org/10.1111/jre.12723>.
- [46] M. Yamauchi, S. Tamaki, K. Tomoda, Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea, *Sleep Breath.* 10 (2006) 189–193, <https://doi.org/10.1007/s11325-006-0074-x>.
- [47] A. Cekici, A. Kantarci, H. Hasturk, T.E. Van Dyke, Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease, *Periodontol* 64 (1) (2014) 57–80, <https://doi.org/10.1111/prd.12002>, 2000.
- [48] G. Hajishengallis, Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (1) (2015) 30–44, <https://doi.org/10.1038/nri3785>.
- [49] H.R. Conti, S.L. Gaffen, IL-17–Mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*, *J. Immunol.* 195 (3) (2015) 780–788, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500909>.
- [50] S.J. Park, H.R. Cho, B. Kwon, Roles of IL-33 in resistance and tolerance to systemic candida albicans infections, *Immune Netw* 16 (3) (2016) 159–164, <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.3.159>.
- [51] A. Gabryelska, P. Kuna, A. Antczak, P. Białasiewicz, M. Panek, IL-33 mediated inflammation in chronic respiratory diseases — understanding the role of the member of IL-1 superfamily, *Front. Immunol.* (2019);10(April) 1–9, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00692>.
- [52] S.L. Gaffen, N.M. Moutsopoulos, Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity, *Sci Immunol* 5 (43) (2020), <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau4594>.

4.1 Capítulo 3.

4.1.1 Descripción artículo 4

Artículo 4: Actividad anti-biopelícula *in vitro* de nanofibras Policaprolactona: Poli (ácido láctico-co-glicólico) cargadas con anfotericina B, péptido antimicrobiano LfcinB (21-25)_{pal} y óxido de zinc para el tratamiento local de la periodontitis asociada con la AOS

Los hallazgos descritos en el capítulo anterior sugieren cambios específicos microbiológicos e inmunológicos asociados a la periodontitis en pacientes con AOS. Ambas condiciones se asociaron con la presencia de las bacterias del complejo naranja y rojo, junto a la presencia de *Candida* spp.; microorganismos que se correlacionaron positivamente con el porcentaje de biopelícula y aumento de citocinas proinflamatorias en los individuos con ambas condiciones. Teniendo en cuenta estos resultados se propuso establecer un modelo de biopelícula polimicrobiana *in vitro*, conformada por nueve bacterias y *C. albicans*, obtenidas de aislados clínicos de muestras de cavidad oral de individuos con Periodontitis y AOS, para evaluar la actividad antimicrobiana y anti-biopelícula de nanofibras de PCL/PLGA incorporando tres compuestos: un antifúngico, como Anfotericina B (AMB); un péptido antimicrobiano, LfcinB (21-25)_{pal} (nombrado en este trabajo como P61); y Óxido de Zinc (ZnO).

Se realizaron siete nanofibras (Nf) de PCL/PLGA (90:10) mediante Electrospinning y se denominaron de la siguiente forma: Nf 1: AMB; Nf 2: AMB-ZnO; Nf 3: P61; Nf 4: P61-ZnO; Nf 5: AMB-P61; Nf 6: AMB-P61-ZnO; y Nf 7: ZnO. Las nanofibras exhibieron una apariencia similar, textura suave, buena estabilidad mecánica y fácil manipulación, con una distribución de diámetro de fibra homogénea (de 233 a 533 nm), siendo notorio un menor diámetro en aquellas nanofibras que contenían ZnO. El carácter hidrofóbico se mejoró en la Nanofibra 6, la cual contenía los tres compuestos. Las nanofibras mostraron ser citocompatibles con fibroblastos de ligamento periodontal humanos, los cuales presentaron una viabilidad mayor al 50% en presencia de las nanofibras. Además, la viabilidad celular mejoró con el tiempo de exposición con un incremento de la viabilidad, efecto atribuido a la presencia de ZnO, al cual se le ha reportado como un regenerador tisular.

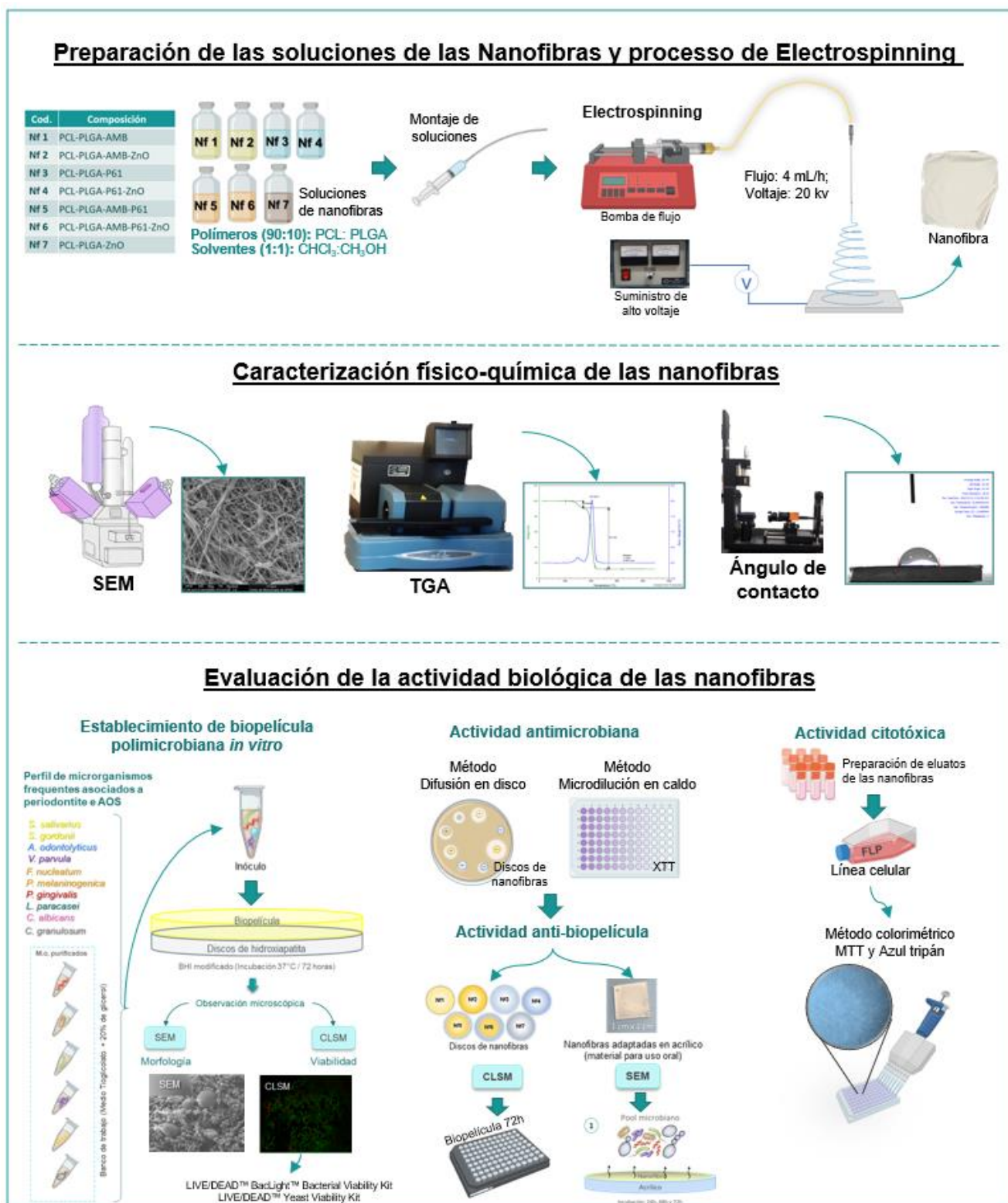
Otro resultado interesante, fue la acción antimicrobiana de la AMB, la cual incorporada en las nanofibras logró disminuir la viabilidad del cultivo microbiano mixto y de la biopelícula polimicrobiana. A pesar que las nanofibras de P61 no mostraron actividad antimicrobiana, las nanofibras cargadas P61 más AMB mostraron un aumento de la actividad, lo que indica una potencial sinergia entre las dos sustancias, la cual podría mejorar con el aumento de la concentración de P61 disponible en las nanofibras y con la presencia de ZnO.

Por otro lado, la Nf 2 presentó actividad antimicrobiana, incluso mucho mejor que la que presentada por la Nf 1, esto puede deberse a la presencia de ZnO, mejorando la actividad de la AMB. La Nf 5 tiene mejores resultados con un mayor tiempo de exposición (72h) y la Nf 6 tuvo la mejor actividad anti-biopelícula, la cual aumenta con el tiempo de exposición, mostrando una disminución del 40% de la viabilidad de la biopelícula polimicrobiana a las 72 h.

En este sentido, los resultados sugieren que la Nanofibra 6, la cual está cargada con los tres componentes evaluados puede ser una potencial herramienta para el tratamiento *in situ* de la periodontitis en personas con apnea obstructiva del sueño.

Los resultados de este artículo están bajo el acuerdo de confidencialidad, por lo tanto, será sometido a publicación una vez se haga el respectivo depósito de propiedad intelectual.

Figura 7. Desarrollo metodológico Artículo 4



4.1.1.1 Manuscrito artículo 4

***In-vitro* antibiofilm activity of Polycaprolactone- Poly (lactic-co-glycolic acid) nanofibers loaded Amphotericin B, antimicrobial peptide LfcinB (21-25)_{pal} and Zinc oxide for local treatment of periodontitis associated with obstructive sleep apnea**

Mayra A. Téllez Corral^{1,2,5}, Jean C. Villamil Poveda¹, Nelly S. Roa Molina¹, Liliana Otero¹,
Claudia M. Parra Giraldo², Ruben D. Sinisterra^{3,5}, Maria E. Cortés^{4,5*}

¹ Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

² Unidad de Investigación en Proteómica y Micosis Humanas, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

³ Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais, Chemistry Department, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Laboratório de Biomateriais e Microbiologia, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Innovation Technology Graduate Program, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Correspondence to: Mayra A. Téllez Corral, cPhD, tellezm@javeriana.edu.co; Maria E. Cortés, PhD, mecortes@ufmg.br, mecortes@yahoo.com

Number of words of manuscript: XX words.

Number of figures: 7

Highlights

- PCL/PLGA Nanofibers delivered AMB, LfcinB (21-25)_{pal} and ZnO, antimicrobial agents against polymicrobial biofilm related to periodontitis associated with obstructive sleep apnea.
- PCL/PLGA Nanofibers loaded with AMB, LfcinB (21-25)_{pal} and ZnO were not cytotoxic on periodontal ligament fibroblastic cells.
- PCL/PLGA Nanofibers loaded with AMB, LfcinB (21-25)_{pal} and ZnO exhibited good physicochemical properties
- PCL/PLGA Nanofibers loaded with AMB, LfcinB (21-25)_{pal} and ZnO exhibited good antimicrobial and anti-biofilm activity against bacteria and *C. albicans* biofilm.

Abstract

Periodontitis has been linked to obstructive sleep apnea (OSA). The stage III periodontitis is more prevalent in OSA severe and the oral microbiome changes due to an increase in periodontal pathogenic bacteria and *C. albicans*. Nanofiber drug delivery systems may be used for local antimicrobial therapy against microorganisms related to periodontitis and OSA. The aim of the present study was manufacture PCL/PLGA nanofibers incorporating an antifungal, Amphotericin B (AMB); an antimicrobial peptide, LfcinB (21-25)_{pal} (P61); and zinc oxide, for the inhibition of *in vitro* polymicrobial biofilms. Nanofibers were produced by electrospinning method: PCL/PLGA loaded with: AMB (Nf 1), AMB-ZnO (Nf 2), P61 (Nf 3), P61-ZnO (Nf 4), AMB-P61 (Nf 5), AMB-P61-ZnO (Nf 6) and ZnO (Nf 7). Different methods were used to physically and chemically characterize the nanofibers. The biocompatibility of all nanofibers was demonstrated by Human Periodontal Ligament Fibroblasts (HPdLF) cell viability of more than 50%. The antimicrobial and anti-biofilm activities of the nanofibers were assessed using qualitative and quantitative analyses. The Nf 6 showed a higher inhibition of viability of nine bacteria and *C. albicans* and biofilm formation, that increases with exposure time (72 h). The AMB-P61-ZnO-loaded PCL/PLGA nanofiber (Nf 6) may offer a promising strategy for treating localized cases of periodontitis in those with obstructive sleep apnea.

Keywords: periodontitis, OSA, polymicrobial biofilm, nanofibers, PCL, PLGA, Amphotericin B, antimicrobial peptide LfcinB (21-25)_{pal}, Zinc oxide, anti-biofilm activity.

1. Introduction

Periodontitis is a multifactorial chronic infectious and inflammatory disease that is caused by the presence of pathogenic microbial communities, called dysbiotic microbiota, organized in stratified polymicrobial biofilms [1,2], that cause a chronic inflammatory response of the periodontal tissue, resulting in the formation of periodontal pockets, progressive loss of periodontal insertion with destruction of the soft and hard tissues of periodontal support, and subsequent loss of teeth [3]. In recent years, systemic diseases and conditions like the obstructive sleep apnea (OSA) have been linked to periodontitis [4,5]. The OSA is a respiratory sleep disorder, caused by the interaction of genetic factors with obstructive anatomical, neuromuscular or inflammatory factors that obstruct the airway, blocking the passage of air [6]. This disorder occurs when the soft tissues around the upper airway collapse, partially (hypopnea) or completely (apnea), obstructing airflow despite increased ventilatory effort [7].

Systematic studies and meta-analyses have proposed various plausible causes for the relationship between OSA and periodontitis: 1. Intermittent hypoxia may provide the conditions for systemic inflammation and oxidative stress. 2) Drying of the mouth brought on by prolonged open breathing might impede the oral mucosa from being cleaned by saliva flow, which may accelerate the development of periodontitis. 3) The pH is dropping, which can be encouraging microbial colonization and, consequently, the development and buildup of dental plaque. 4) The composition and ecology of the oral microbiota may be influenced by OSA-associated inflammation and intermittent declines in oxygenation, which may affect the development of periodontitis. And 5) Both OSA and periodontitis are associated with systemic inflammation, which may help to explain the connection between these two conditions [4,5].

Different microbiological techniques, including qPCR, 16S rRNA gene sequencing, and MALDI-TOF, were used to characterize the oral microbiota of individuals with periodontitis and OSA. The findings indicated that the oral microbiota's species richness and diversity had changed, accompanied by a rise in periodontal pathogens including *Fusobacterium* sp., *Tanarella* sp., and *Prevotella* sp. and yeasts like *Candida* sp. [8–10]. Additionally, *Candida* sp. was closely linked to the bacteria of the orange and red Socransky's microbial complexes, as well as the severity of OSA, which was more prevalent in individuals with stage III periodontitis [8].

In cases of patients with severe periodontitis, scaling and root planing (SRP), the standard approach of non-surgical periodontal therapy (NSPT), may not be enough to restore periodontal health [11]. It is therefore necessary to use additional antiseptics like chlorhexidine (CHX); however, this lowers salivary pH, which increases the risk of dental demineralization, parotid gland inflammation, tooth and oral soft tissue pigmentation, type 1 hypersensitivity reactions, taste perversion, and burning sensations [12]. Amoxicillin and metronidazole are two other supplementary treatments to SRP that have substantial scientific support for their usage in daily clinical practice [13], however, patients may not respond well to standard NSPT because it cannot modify the dysbiotic infectious process to a homeostatic or commensal equilibrium. This is likely because the periodontal pocket still contains subgingival biofilm after treatment and/or periodontopathogenic microorganisms have invaded the tissue. Moreover, the use of antibiotics must be restricted to specific periodontal patients, with defined and limited dosages, taking into account both systemic side effects and negative microbiological effects, such as the emergence and spread of antibiotic resistance [12]. This is related to the fact that the likelihood of antibiotic treatment success is decreased since the administration of antibiotics is not directed towards preventing infection by polymicrobial biofilms linked to yeasts [14]. All of these factors may limit effective therapy, allowing periodontitis to progress.

Nevertheless, antimicrobial agents can be administered *in-situ* using devices known as Controlled Drug Delivery Systems (CDDS). These systems can encapsulate therapeutics, enhance their biopharmaceutical properties and efficacy, adapt to different administration routes, shield drugs from the environment, and enable controlled and directed release, among other benefits [15]. CDDS offer continuous drug administration at higher concentrations and directly to the infection site, with sustained release over prolonged periods; this is an advantage over systemic therapy (multiple dosage administered over longer periods). Better patient compliance with their administration, a decrease in toxic effects, and systemic complications such side effects of systemically administered antibiotics are additional advantages of these systems [16,17]. Nanofibers, a form of CDDS, offer great drug loading efficiency and have been used in the field of dentistry to deliver sufficient drug concentrations right at the target tissue (pocket/periodontal tissue). Due to their biodegradable, biocompatible, low-toxicity qualities, and FDA-approved, Poly

(ϵ -caprolactone) (PCL) and Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) are two polymers that are frequently utilized as CDDS (nanofibers) [18].

The Amphotericin B (AMB) is fungicidal antifungal that usually is administered parenterally and has a broad spectrum of action against fungi that cause systemic mycoses [19]. Even, it is used to treat oral candidiasis, and it is further applied topically for 14 days at a dose of 100 mg/mL as a cream, ointment, or lotion [20]. It works by attaching to the cell membrane's ergosterol and altering its permeability, resulting in the loss of cytoplasmic material and cell lysis. *In vitro* antifungal activity of AMB has been reported against most *Candida* species associated with oral infections, including *C. albicans* [21] and also, AMB has been shown to be effective against *C. albicans* biofilms [22].

Bovine lactoferricin, also known as lactoferricin B (LfcinB), is a peptide with 25 amino acids that exhibits antibacterial, antifungal, antiparasitic, antiviral, and anticancer activity due to the presence of the minimum motif RRWQWR in its structure [23–25]. The palindromic LfcinB (21-25)_{pal}: RWQWRWQWR has been shown to have significant antimicrobial activity, suggesting it a promising peptide for the development of novel medicinal agents. [26]. On the other hand, zinc oxide (ZnO) has the power to remove bacteria linked to caries [27]. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, and *F. nucleatum* are among the bacteria that are successfully stopped from growing by ZnO [28] and similarly, ZnO has shown antifungal action against *C. albicans* biofilms [29]. The viability and osteodifferentiation of periodontal ligament stem cells were supported by even ZnO nanoparticles in nanofibers, which showed antibacterial action against reference strains of *P. gingivalis* and *F. nucleatum* with low cytotoxic activity [30,31]. A controlled and sustained release of oxytetracycline hydrochloride was also made possible by ZnO nanoparticles present PCL nanofibers, with a release rate of 3.7 g/mL from 1 to 4 hours, higher than the rates attained by systemic administration of the antibiotic [16].

Incorporating AMB, Lfcin (21-25)_{pal}, and ZnO all at once into PCL/PLGA nanofibers may provide a prolonged release of these compounds, as anti-biofilm agents for use in treatment periodontitis in OSA patients. The current study's objective was to assess the antimicrobial activities of PCL/PLGA nanofibers incorporating AMB, Lfcin (21-25)_{pal}, and ZnO for the inhibition of *in vitro* polymicrobial biofilms related to periodontitis associated with OSA.

2. Materials and methods

2.1 Nanofibers materials

The polymers, poly ϵ -caprolactone (PCL) (Mw= 43,000-50,000 g/mol) and Poly (lactic-co-glycolic acid, 75:25) (PLGA) (Mw= 66,000-107,000 g/mol) were purchased from Polysciences, Inc., (USA) and Sigma-Aldrich, Brazil Ltda, respectively. Chloroform (CHCl₃) and methanol (CH₄O) were acquired from Vetec (Brazil). Amphotericin B (AMB) (Mw= 924.08 g/mol) was purchased from Sigma-Aldrich, Brazil Ltda. The antimicrobial palindromic peptide (P61: LfcinB (21-25)_{pal}) was supplied by SAMP-UNAL (Group Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas at Universidad Nacional de Colombia). Zinc oxide (ZnO) particles were supplied by LEMB-UFMG (Laboratory of Molecular Encapsulation and Biomaterials at Universidade Federal de Minas Gerais).

2.2 Microorganisms and cellular lines

The microorganisms were obtained from the collection of clinical isolates collected from oral samples cultured from individuals with OSA and with periodontitis [8], stored at *Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO)* of the Faculty of Dentistry at the *Pontificia Universidad Javeriana-PUJ*, Bogotá, D.C., Colombia. Microbiological tests were performed using nine bacteria and one yeast isolated: *S. salivarius*, *S. gordonii*, *A. odontolyticus*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *C. albicans*, *L. paracasei* and *C. granulosum*. Prior to the experiments, all microorganisms were pre-cultivated in modified Brain-Heart Infusion (BHI) (Millipore Corp.) and on Trypticase™ Soy Agar with 5% Sheep Blood (Becton Dickinson). This modified BHI was supplemented with 2.5 g/L mucin, 1.0 g/L yeast extract, 0.1 g/L cysteine, 2.0 g/L sodium bicarbonate, 5.0 mg/ mL hemin, 1.0 mg/mL menadione and 0.25% (v/v) glutamic acid [32]. XTT ((2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfo- phenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) were purchased from Sigma-Aldrich®.

The cytotoxicity tests were performed using Human Periodontal Ligament Fibroblasts (HPdLF), which was supplied by CIO-PUJ. The HPdLF was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Gibco®). The medium was supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco®), and antibiotic and antimycotic solution (Gibco®). MTT (3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were purchased from Sigma-Aldrich®.

2.3 Preparations of nanofibers solutions and electrospinning process

The PCL/PLGA nanofibers were fabricated by conventional electrospinning method. Seven nanofibers were obtained: PCL/PLGA loaded with AMB (Nf 1), PCL/PLGA loaded with AMB and ZnO (Nf 2), PCL/PLGA loaded with P61 (Nf 3), PCL/PLGA loaded with P61 and ZnO (Nf 4), PCL/PLGA loaded with AMB and P61 (Nf 5), PCL/PLGA loaded with AMB, P61 and ZnO (Nf 6) and PCL/PLGA loaded with ZnO (Nf 7). To prepare all the nanofibers, 900 mg of PCL and 100 mg of PLGA were dissolved in 10 mL of a mixture of chloroform and methanol - CHCl₃:CH₃OH (1:1). For each nanofiber preparation, 15 mg AMB, 3 mg P61 and 40 mg ZnO were added in the polymeric solution, respectively. The solutions were stirred for 24 hours at room temperature before the electrospinning process. Then, using a syringe pump (Harvard Apparatus PHD 2000), each solution was dispensed into a 10 mL standard syringe with a 27 G blunted stainless-steel needle. The electrospinning process was carried out at a voltage of 20 kV, a solution flow rate of 4 mL/h, and a distance of 15 cm from the needle tip. Nanofibers were collected and preserved for physicochemical characterization, cytotoxicity assays, and microbiological tests.

2.4 Physicochemical characterization

2.4.1 Nanofiber morphology by Scanning electron microscopy (SEM)

The morphology and average diameter of nanofibers were determined using the scanning electron microscope FEG- Quanta 200 FEI, at an accelerating voltage of 20 kV. Applying a sputter coater, samples of nanofibers were coated with a layer of carbon that was 5 nm thick (Bal-Tec, MD20 instrument). Using Image J software and at least 100 observations, average nanofiber sizes were determined. To further establish the existence of the various elements in the nanofibers, energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) and chemical histogram were carried out using EDS coupled in FEG-Quanta 200 (UFMG).

2.4.2 Thermal analysis

The TGAQ5000 equipment from TA Instruments was used to perform the thermogravimetry analysis (TGA). The nanofibers loss weight during heating was determined by Thermogravimetry (TG) and Derivate thermogravimetry (DTG). Nanofiber samples were heated under nitrogen gas

at a flow rate of 50 mL/min from 25 °C to 900 °C at a rate of 10°C/min. The software TA instrument universal analysis 200 was used to examine the data.

2.4.3 Contact angle measurement

The Contact Angle Measuring System, model SEO Phoenix 300 Touch contact angle, was used to assess the wettability of the nanofibers. To determine the contact angles, water was dropped onto the nanofibers' surface from a sample stand. The average contact angle was determined using Surfaceware9 software after a camera captured the drop's image.

2.5 Cytotoxicity test

2.5.1 Preparation of eluates from nanofibers

Eluates from the nanofiber's supernatants were produced to test the cytotoxicity of the nanofibers. Nanofibers (Nfs 1-7) samples were incubated with 1 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) for 24, 48 and 72 hours at 37 °C, then the nanofiber samples were removed and eluates were used for the cytotoxicity tests.

2.5.2 Cell cultures and cell toxicity assay

Human Periodontal Ligament Fibroblasts (HPdLF) (Lonza Bioscience) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, and antibiotics (0.1 mg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin) and incubated in a humidified environment of 5% CO₂ kept 37°C. After being subcultured to 80% confluence, the HPdLF were seeded at a density of 10.000 cells per well into 96-well plates. Cells were exposed to nanofiber eluates for 24 hours and the untreated control, HPdLF were not exposed to the eluted nanofibers. After that, cell viability was evaluated using trypan blue exclusion assay and photograph three random fields per well. Also, the 96-well plates were covered with 30 µL of MTT solution (1 mg/mL in PBS), and incubated at 37°C for 4 hours in the dark in a humidified environment of 5% CO₂. The formazan crystals were then dissolved using 100 µL DMSO. Using a BioTek ELx800™ microplate reader and the Gen5™ Data Analysis Software, optical densities (OD) at a wavelength of 492 nm were recorded. Each experiment was carried out in triplicate three times independently.

2.6 Microbiological test

2.6.1 Disk diffusion method

Candida albicans culture and a mixed microorganism culture were used to test the nanofibers' initial antibacterial activity using the agar diffusion method. The test was conducted using nanofiber disks (diameter: 5 mm) applied on the surface of Sabouraud agar and BHI agar, previously spread with 100 μ L of *C. albicans* and mixed microorganism's culture solutions (OD 600 nm, 0.8-1.0), respectively. The *C. albicans*' plates were incubated aerobically for 48 h and the mixed microorganisms' plates incubated anaerobically (90% nitrogen, 10% CO₂) at for 72 hours at 37 °C. Following incubation, the inhibition zone's clear areas' diameters in millimeters were measured, and the results were represented by the mean value \pm standard deviation (SD).

2.6.2 Broth microdilution method

The broth microdilution method was used to assess nanofiber's antimicrobial effectiveness against a mixed microorganism's culture. The nanofiber disks (diameter: 5 mm) and mixed microorganisms' culture suspensions (OD 600 nm, 0.8-1.0), were employed. The modified BHI broth and mixed microorganism's culture suspension were used as negative and positive controls, respectively. The nanofiber disks were put on 96-well plates. Each well was then filled with 50 μ L of mixed microorganism's culture and 50 μ L of culture broth. Then, the plates were incubated for 24, 48 and 72 h at 37 °C in an anaerobic environment (90% nitrogen, 10% CO₂). After incubation time, the nanofiber disks were carefully removed from the 96-well plates. Each well was covered with 100 μ L of XTT solution (1 mg/mL in PBS), and incubated at 37°C for 2 hours in the dark and in an anaerobic environment (90% nitrogen, 10% CO₂). Every test was performed six times, and the tested solutions were measured at 490 nm using a Lambda 25 UV-vis spectrophotometer (Perkin Elmer, USA).

2.6.3 In vitro biofilm experiments

Polymicrobial biofilms were tested for susceptibility to nanofibers with established antimicrobial activity. The ten microorganisms selected were used to develop *in vitro* biofilms over CELLview™ cell culture Slides (Greiner Bio-one). The microorganisms' concentration was adjusted by spectrophotometry, in order to obtain an inoculum in modified BHI (OD 600 nm, 0.8-

1.0). Each well was filled with 100 μL of inoculum prepared and incubated in an anaerobic environment (90% nitrogen, 10% CO_2) at 37°C for 72 h [32]. To get removal of planktonic microorganisms after the incubation, the biofilms were gently rinsed with sterile PBS. Then 100 μL of fresh modified BHI was added per well and nanofiber disks were gently immersed on each well. Biofilms that weren't nanofiber-treated were used as the negative control. Then, the treated and untreated biofilms were incubated in an anaerobic environment (90% nitrogen, 10% CO_2) at 37°C for 24, 48 and 72 h. Subsequently, the biofilms viability was determined by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).

Before the CLSM analysis, the nanofibers were gently removed from wells and the biofilms were rinsed in 100 μL of sterile PBS, in order to eliminate nonadherent microorganisms. Then, biofilms were stained with LIVE/DEAD® BactLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen) and LIVE/DEAD™ Yeast Viability Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Total fluorescence staining of the micrographs taken by the Olympus FV1000 confocal microscope was analyzed using the image analysis software ImageJ (NIH, USA), to determine the cell viability inside the treated and untreated biofilms.

Additionally, in order to observe the anti-biofilm activity, the nanofibers were exposed to 500 μL of microorganisms' inoculum adjusted (OD 600 nm, 0.8-1.0), and incubated in an anaerobic environment (90% nitrogen, 10% CO_2) at 37°C for 24, 48 and 72 h. Then, the nanofibers were washed with PBS and placed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) overnight. After, they were washed with PBS to remove the glutaraldehyde and dehydrated with 70, 90 and 100% of ethanol for 30 minutes, three times. The nanofibers were coated with carbon (thickness: 5 nm) and imaged with a Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL, model JSM 6490-LV) in high-vacuum mode at 15kV.

2.7 Statistical analysis

Tukey's multiple comparison test and a two-way analysis of variance (ANOVA) were employed to assess the differences between microorganisms or biofilm treated and the microorganism and biofilm untreated. The level of significance was set to $p < 0.05$. Software GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software, California, USA) was used.

3. Results and discussion

3.1 Physicochemical characterization

The nanofibers exhibited a similar aspect, smooth texture, good mechanical stability and easy manipulation. SEM images evaluated the nanofibers' morphology and diameter. The PCL/PLGA nanofibers charged with AMB, P61 and/or ZnO were made of randomly distributed nanometer-sized fibers (Figure 1). The nanofibers presented a homogeneous fiber diameter distribution (from 233 to 533 nm). The Nanofibers 1, 3, and 5 exhibited beads, possibly formed by the AMB and P61 presence in solution during the electrospinning process, However, the presence of beads decreased in the presence of ZnO in the nanofibers and produced a lower average fiber diameter compared to those ZnO-free. These results have been reported by others authors, that determined a reduction of the nanofiber diameter after incorporation of ZnO particles [16], meanwhile the incorporation of LfcinB (21-25)_{pal} increase the beads formation in nanofibers [26], that could be improved by the incorporation of ZnO (Figure 1B, 1D and 1F). According to the EDS analysis, ZnO particles were successfully incorporated into nanofibers (Figure 1H), while the other nanofibers had peaks related to the elements carbon and oxygen.

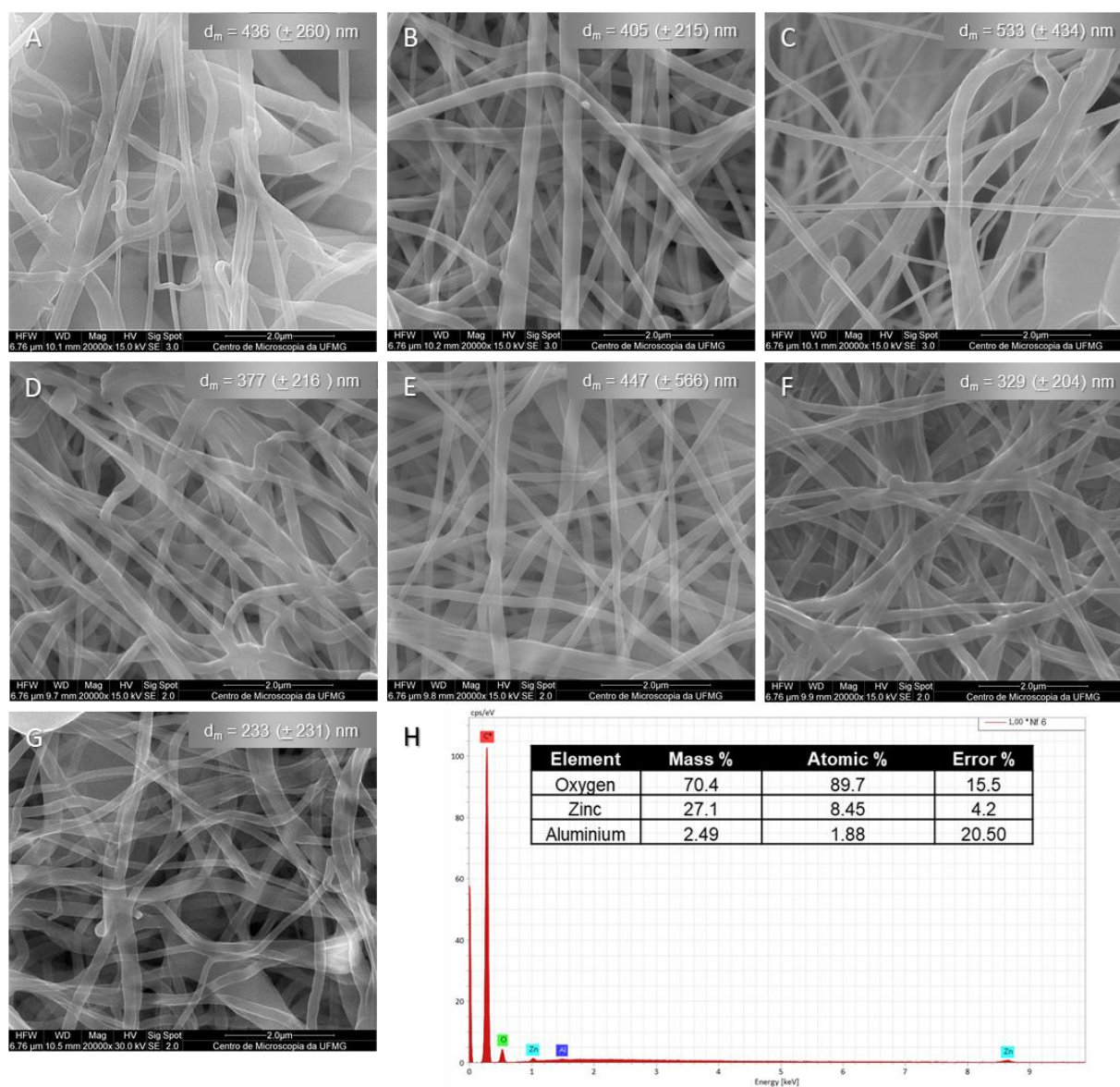


Figure 1. SEM micrographs: the morphology and mean diameter (d_m) and standard deviation ($\pm SD$) of PCL/PLGA nanofibers: (A) Nf 1: AMB, (B) Nf 2: AMB-ZnO, (C) Nf 3: P61, (D) Nf 4: P61-ZnO, (E) Nf 5: AMB-P61, (F) Nf 6: AMB-P61-ZnO, (G) Nf 7. Representative EDS analysis of Nf 6.

The thermogravimetric analysis described the chemical and physical changes that took place while nanofibers were heated. The analysis of the TG and DTG curves was used to determine the thermal stability of nanofibers. The figure 2 shows the thermal degradation of the PCL/PLGA nanofibers as well as pure AMB and ZnO particles. P61 was not evaluated for the amount available. Pure AMB had a gradual degradation from 200°C, while the ZnO particles exhibited high thermal stability until 900°C, with a weight loss of 4.3%. This result is consistent with what Magalhães *et al.* reported in 2019 [16]. The curves showed that the nanofibers did not significantly degrade as a function of temperature up to 350°C and that the addition of the AMB or ZnO did not significantly alter this behavior, showing the PCL/PLGA nanofibers exhibited high thermal stability [16,33].

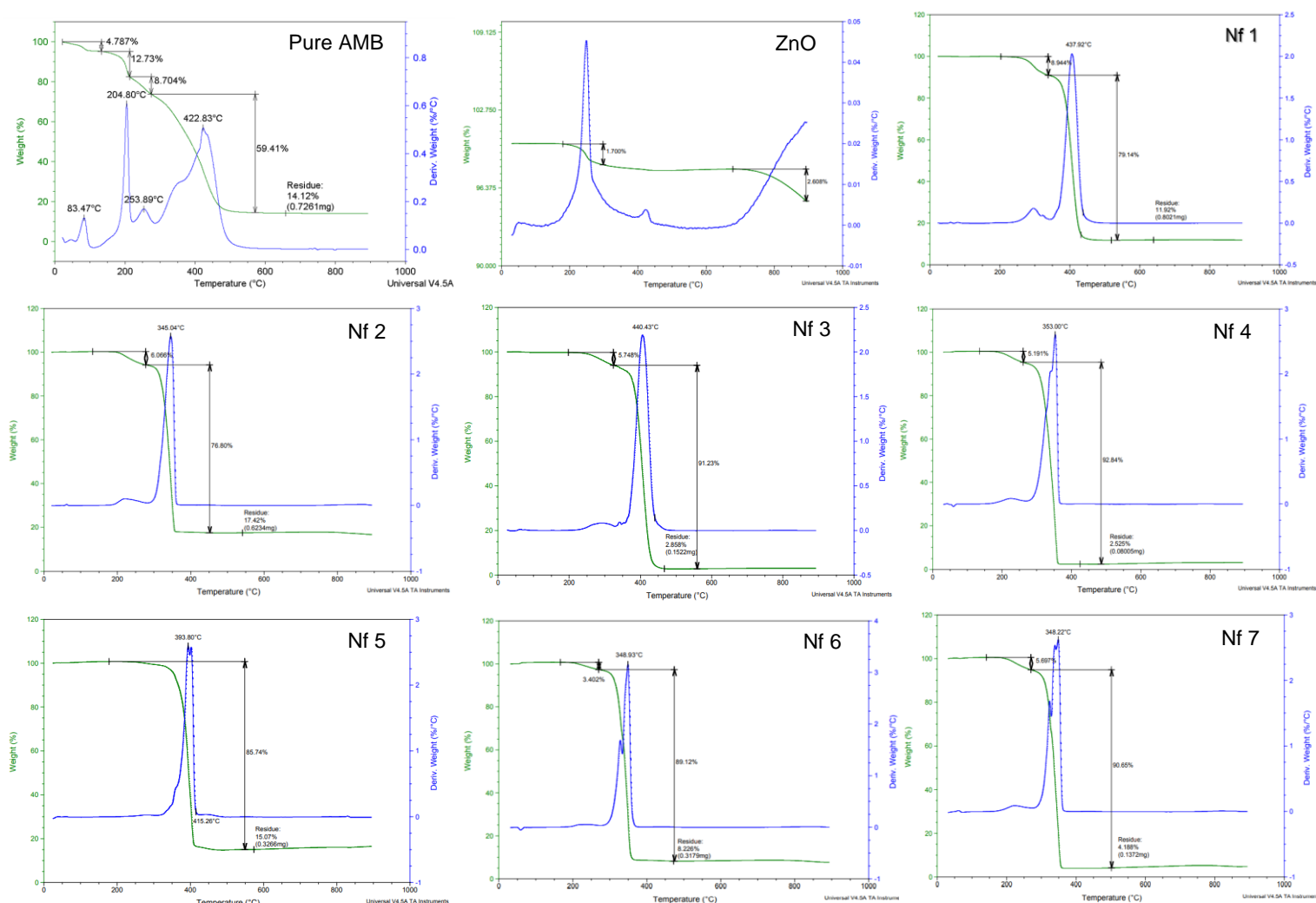


Figure 2. TG and DTG curves of PCL/PLGA nanofibers and pure AMB.

To evaluate the hydrophilicity of the nanofibers, the contact angles of their surfaces were evaluated. The contact angles for the PCL/PLGA nanofibers are shown in Figure 3. All nanofibers, except the nanofibers 4 and 6, presented a hydrophobic surface (contact angle higher than 90°), showing poor wettability, as consequence of hydrophobic nature of PCL and PLGA polymers. Also, the nanofibers with ZnO showed a hydrophobic character, however the nanofiber 4 and 6 showed the lowest contact angle due to the combination of P61 and ZnO. Due to its extremely hydrophilic nature, a nanofiber 4 image could not be displayed.

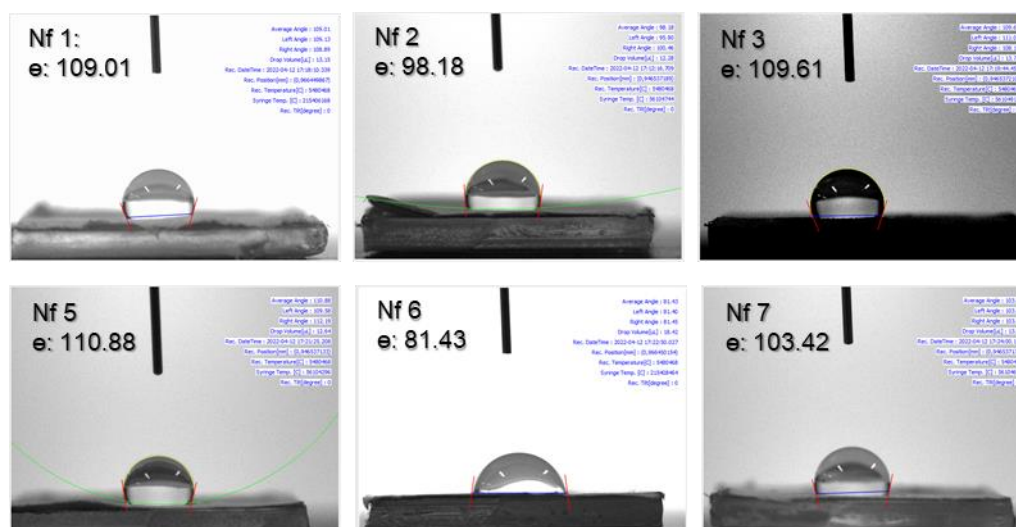


Figure 3. Images of the contact angle (Θ) formed between water and PCL/PLGA nanofibers.

3.2 Cytotoxicity test

The Human Periodontal Ligament Fibroblasts (HPdLF) cell line was used to perform an indirect contact MTT assay to determine the cytotoxicity of nanofibers (Figure 4). The cytotoxicity was calculated based on cell viability relative to control (cells untreated), adjusted to 100% of viability (Figure 4). Grades of cytotoxicity were assigned, with non-cytotoxic being defined as viability values greater than 90%, slightly cytotoxic being defined as viability values between 60% and 90%, moderately cytotoxic being defined as viability values between 30% and 59%, and severely cytotoxic being defined as viability values lower than 30% [16]. Moreover, the cytocompatibility of nanofibers is considered when the cell viability is higher than 50% [30].

Although the nanofibers were slightly cytotoxic, all of them presented a cell viability higher than 50%. The least cytotoxic of the complete group of nanofibers were nanofibers 3 and 4, which

were loaded with P61. Surprisingly, the cell viability improved with the exposure time. This result might be explained by the presence of AMB, P61, and ZnO, which might stimulate cellular growth. The viability and osteodifferentiation of periodontal ligament stem cells have been reported to be supported by zinc oxide particles, without adversely impacting their biocompatibility traits [31]. Other authors reported that ZnO has a great potential used in guided tissue/bone regeneration strategies in the periodontal treatment [16,30]. It is important to verify these findings using other methods, such as Annexin V Apoptosis Assay and to find out whether AMB and P61 can stimulate *in vitro* cell growth.

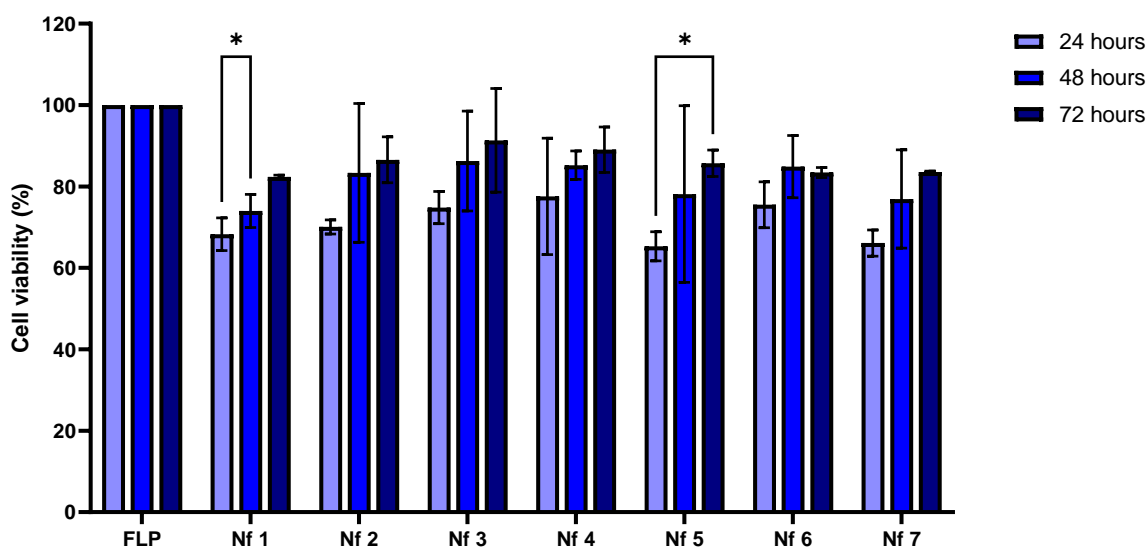


Figure 4. Viability of HPdLF in presence of nanofibers' eluates measured by the MTT (DO_{492nm}) method.

3.3 Antimicrobial activity

The oral microbiota of individuals with periodontitis and OSA was characterized and defined by a rise in periodontal pathogens including *Fusobacterium* sp., *Tanarella* sp., and *Prevotella* sp. and yeasts like *Candida albicans*, [8–10]. The severity of OSA, which was more prevalent in individuals with stage III periodontitis, and the bacteria in the orange and red Socransky's microbial complexes were both closely related to *Candida albicans* [8]. These microorganisms have the

capacity to build polymicrobial biofilms that are challenging to eradicate or prevent, given their complex physical and biological characteristics [34].

The antimicrobial activity of PCL/PLGA nanofibers loaded AMB (Nf's 1, 2, 5 and 6), P61 (Nf's 3, 4, 5 and 6) and ZnO (Nf's 2, 4, 6 and 7) was tested against *C. albicans* alone and mixed microorganisms' culture, composed of nine bacteria and *C. albicans*. The studies related to nanofibers as potential drug delivery systems for the treatment of periodontitis, had reported mainly antibacterial activity of metronidazole, amoxicillin, ciprofloxacin and tetracycline loaded in PCL nanofibers [16,30,35–37]. These antibiotics does not have activity against yeasts. This study performed PCL/PLGA nanofibers that were loaded with AMB, which demonstrated antimicrobial action against the mixed microbial culture, being the first study to describe this activity (Figure 5C). Although, P61-loaded nanofibers did not show antimicrobial activity, the AMB and P61-loaded nanofibers showed an increase in antimicrobial activity, indicating a potential synergy between the two substances. The available concentration of the peptide in the nanofiber may be the cause of the lowest antibacterial activity of P61-loaded nanofibers. The ZnO-loaded nanofibers demonstrated increased activity compared to unloaded ZnO nanofibers (Figure 5).

Because the PCL/PLGA nanofibers can release drugs that persist for a long time [37,38], the antimicrobial action is time-dependent, however, each nanofiber's activity varied (Figure 5D). The microdilution method confirmed the antimicrobial activity of Nf 2 (AMB-ZnO) against the mixed microbial culture, which increases with the time exposure. Additionally, after 48 and 72 hours, Nf 3 (P61) showed improved antimicrobial activity; however, in the presence of ZnO (Nf 4), activity did not improve, and equivalent results between Nf 3 and Nf 4 were observed. The results obtained from Nf 4 were not improved by the addition of AMB (Nf 5), however the antimicrobial activity at 24 hours is improved by ZnO (Nf 6) in comparison to the other nanofibers at the same exposure time. The results after 48 hours of Nf 6 were comparable to those of Nf 2. In comparison to 48 hours, this nanofiber's antimicrobial activity decreased by 10% at 72 hours.

The presence of ZnO in the Nf 4 may enhance the antimicrobial activity of P61, that had been reported against Gram-negative and Gram-positive bacteria [24]. The antimicrobial activity of ZnO-loaded nanofiber (Nf 7) was not shown by the disk-diffusion test, conversely, this nanofiber showed antimicrobial activity by microdilution method, reducing 15% the viability of mixed

microorganisms. Similar results demonstrated antibacterial activity against Gram-negative bacteria [16].

These findings lead to the conclusion that nanofibers 1, 2, 5 and 6 may possess potential antibacterial activity.

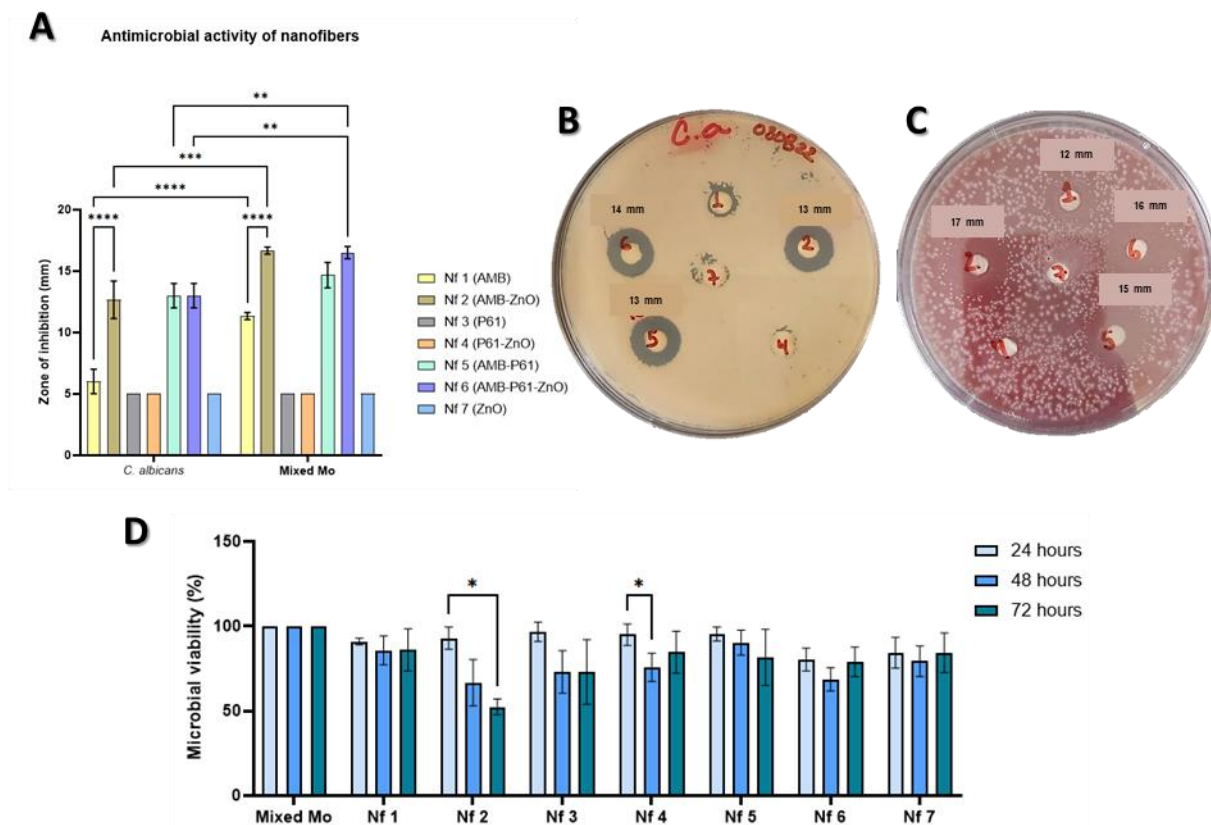


Figure 5. Antimicrobial activity of nanofibers' discs. (A) Growth inhibition of *C. albicans* and mixed microorganisms. (B) Representative macrophotographs showing growth inhibition of *C. albicans*. (C) Representative macrophotographs showing growth inhibition of mixed microorganisms. (D) Viability (%) of mixed microorganisms for 24, 48, and 72 hours in the presence of nanofiber discs. Data was generated from a 2Way-ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons ($p < 0.05$).

Using the CLSM technique, nanofibers 1, 2, 5 and 6 were selected based on the previous results to assess the anti-biofilm activity (Figure 6). The Nf 6 had better activity when comparing the anti-biofilm activity between nanofibers and between exposure times, and this activity grew stronger with exposure time. The Nf 6 decreased a 40% the biofilm viability at 72 h. The number of dead cells (in red color) at 72 hours revealed that the combination of AMB, P61 and ZnO in Nf 6, has stronger anti-biofilm activity (Figure 6C). The Nf 2 continues to present antimicrobial activity, even much better than that presented by the Nf 1, this may be due to the presence of ZnO, improving the activity of the AMB. The Nf 5 has better results with a longer exposure time (72h).

On the other hand, it was determined how well AMB, P61 and ZnO loaded in the nanofibers could prevent microorganisms' adherence to them. The four nanofibers limited the formation of a biofilm, despite evidence that microorganisms, primarily coccoid bacteria, are adherent to the nanofibers. This inhibition is correlated with exposure duration; a longer the exposure time, the stronger the inhibition. There was no evidence of even the presence of yeasts or hyphae (Figure 7). These findings must be confirmed by measuring each microorganism exposed to the nanofibers using molecular methods.

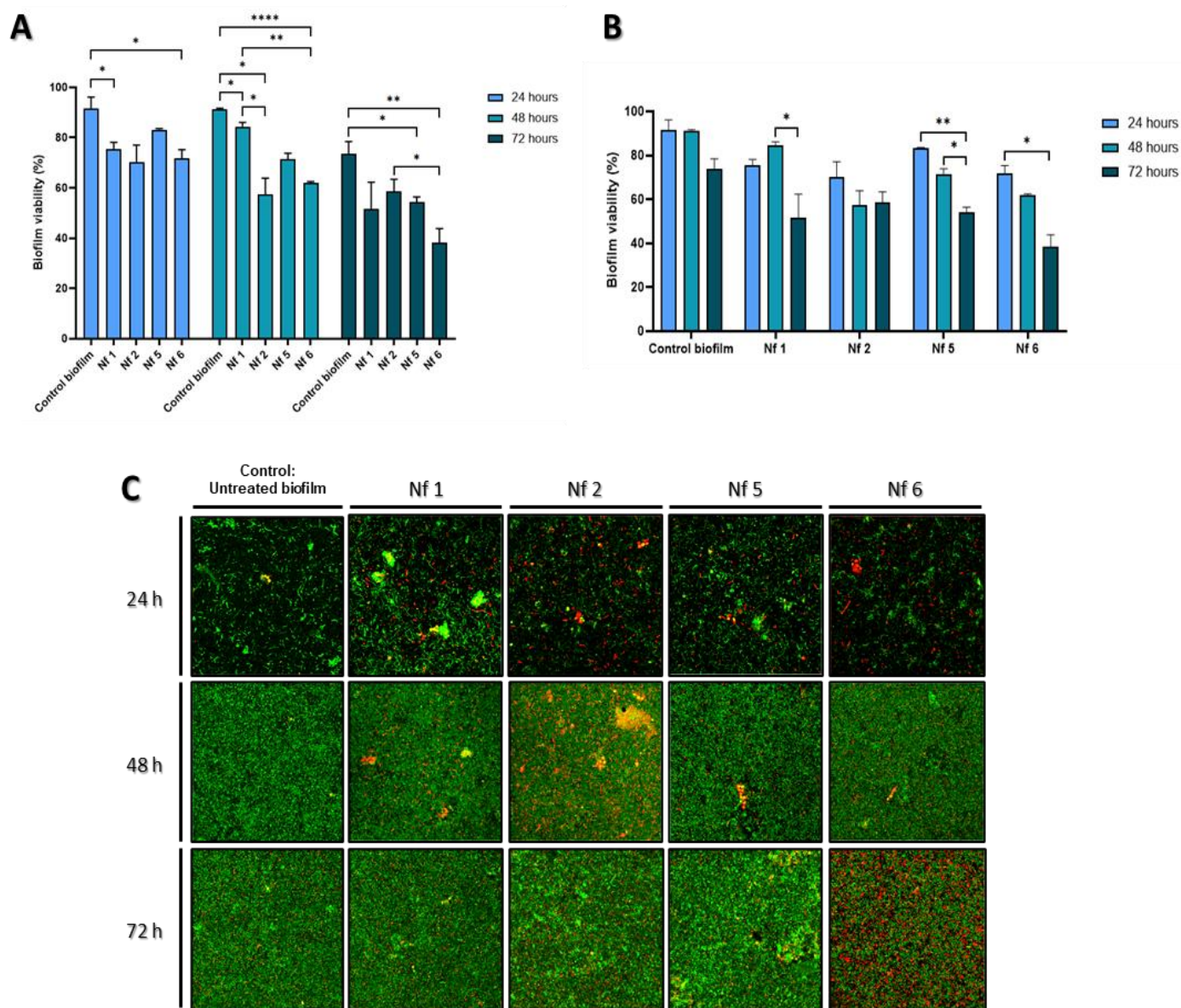


Figure 6. Anti-biofilm activity analyzed by CLSM. (A) Biofilm viability (%) in the presence of nanofiber discs: comparison of the anti-biofilm activity of the different nanofibers. (B) Biofilm viability (%) in the presence of nanofiber discs: analysis of anti-biofilm activity during different treatment times. Data was generated from a Mixed effects analysis, followed by Tukey's multiple comparisons ($p < 0.05$). (C) Confocal micrographs of biofilms treated with nanofiber discs during different times: Green color: live cells; Red color: dead cells.

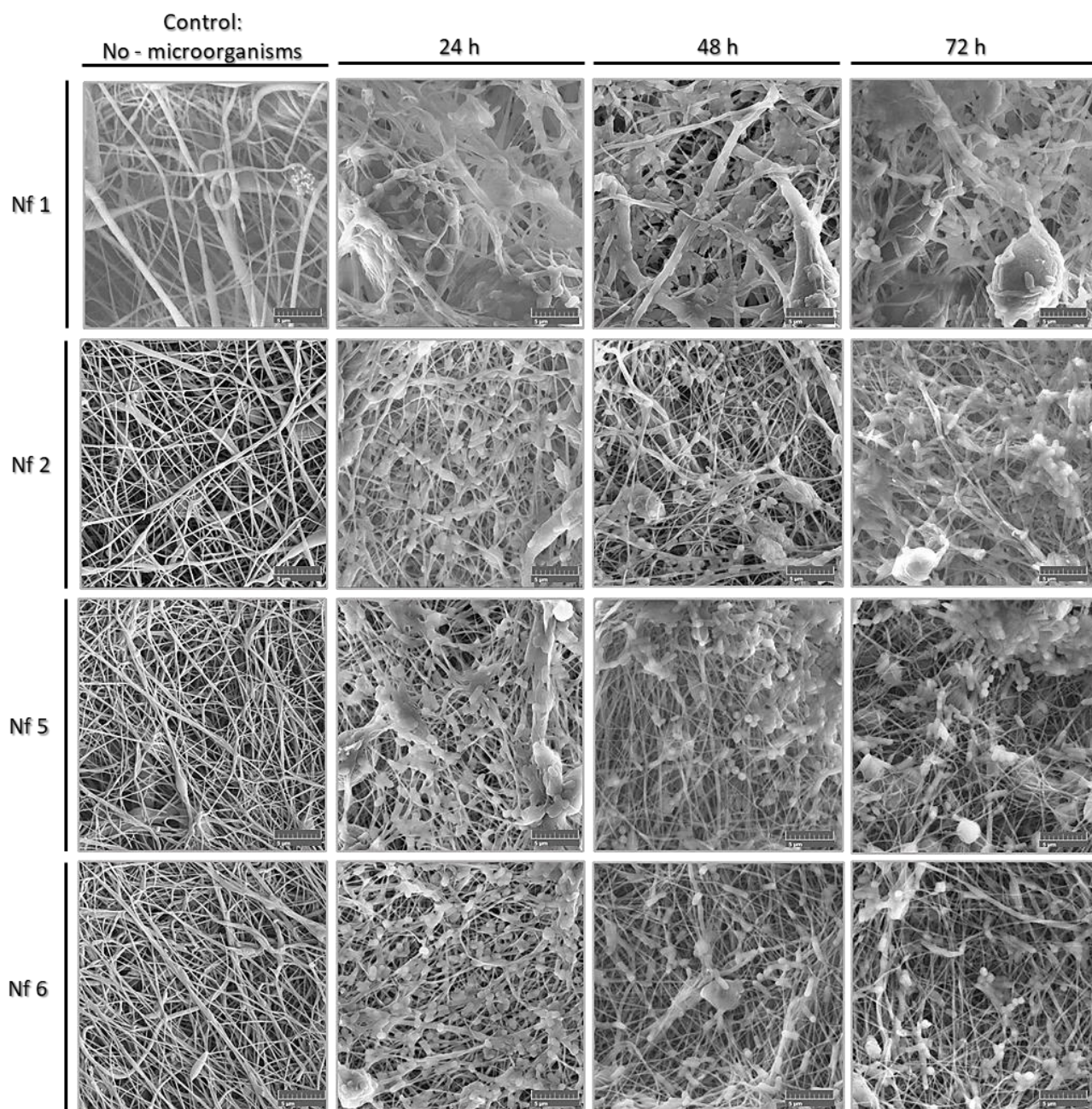


Figure 7. Scanning electron micrograph images of the nanofibers incubated with the microorganisms for 24, 48 and 72 hours. Magnification is 8.00 kx (scale bar; 5 μ m).

The hydrophobic properties of PCL, which were used to manufacture the nanofibers, restrict the release of the drugs tested; as a result, other polymers, such as PLGA, must be used to increase PCL's bioavailability. The majority of the studies discuss an ongoing, prolonged controlled release of antimicrobial agents that is enhanced by other polymers [37,39]. Disk Diffusion method was the primary methodology employed in the majority of research to evaluate the antibacterial activity of nanofibers [16,30,35,36,40,41]. This approach is helpful, but it also requires the use of other tools and quantifiable microbiological methods to complete the data on the ability to inhibit periodontitis-related microorganisms.

There is limited evidence about the anti-biofilm activity against polymicrobial biofilms, which include periodontal pathogenic bacteria and yeast. The majority of research that has been reported on the use of nanofibers for periodontal therapy, evaluated the antimicrobial activity of antibiotics-loaded nanofibers against planktonic bacteria not related to periodontitis [37,39,42].

It is important to note that broad-spectrum antibiotics are primarily used in published research on the use of nanofibers as periodontal therapy; none, however, assess antifungals or antimicrobial peptides. The current study showed antimicrobial and anti-biofilm activity of AMB, P61 and ZnO-loaded PCL/PLGA nanofibers against microorganisms associated with periodontitis and OSA, with low cytotoxicity. These nanofibers may be a potential strategy for local treatment of periodontitis in individuals with obstructive sleep apnea.

4. Conclusions

The electrospinning method was successfully used to manufacture PCL/PLGA nanofibers containing AMB, P61 and ZnO, with good mechanical stability and easy manipulation. Minimal cytotoxicity against Human Periodontal Ligament Fibroblasts (HPdLF) cells, and good antimicrobial and anti-biofilm activity were exhibited by AMB-P61-ZnO-loaded PCL/PLGA nanofibers against to mixed microbial culture and biofilms that contains nine bacteria and a yeast, *C. albicans*, related to periodontitis associated with obstructive sleep apnea. These nanofibers could be a promising approach to treating periodontitis locally in those who have obstructive sleep apnea.

Author Contributions:

Conceptualization, M.A.T.C., C.M.P.G. and M.E.C.; methodology, M.A.T.C., R.D.S. and M.E.C.; software, M.A.T.C.; formal analysis, M.A.T.C.; resources, M.A.T.C., J.C.V. and R.D.S.; writing—original draft preparation, M.A.T.C.; writing—review and editing, M.A.T.C., N.S.R.M., L.O., C.M.P.G., R.D.S. and M.E.C.; supervision, R.D.S. and M.E.C.; project administration, C.M.P.G.; funding acquisition, M.A.T.C., C.M.P.G. and M.E.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments

We thank the *Pontificia Universidad Javeriana-sede Bogotá* for the financial support to the project “*Evaluación de la actividad antimicrobiana de Lactoferricina B (LfcinB) y Anfotericina B (AMB) en sistemas de liberación controlada sobre biopelículas polimicrobianas in vitro relacionadas a la Periodontitis asociada a Apnea Obstructiva del Sueño*” (project number 2054) and we greatly appreciate the support given by the Training Agreement for postgraduate studies of professors of the *Pontificia Universidad Javeriana* for their doctoral training. We also thank L’Oreal foundation and UNESCO for the support to this project by the Program “For Woman in Science 2021”. Also, we thank the Microscopy Center of the UFMG (Brazil) and the μ -core, Microscopy Center of the University of the Andes (Colombia) for their support with Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Microscopy (CLSM).

References

- (1) Haffajee, A. D.; Socransky, S. S.; Patel, M. R.; Song, X. Microbial Complexes in Supragingival Plaque. *Oral Microbiol. Immunol.* **2008**, *23* (3), 196–205. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x>.
- (2) Ximenez-Fyvie, L. A.; Haffajee, A. D.; Socransky, S. S. Microbial Composition of Supra- and Subgingival Plaque in Subjects with Adult Periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2000**, *27* (10), 722–732. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2000.027010722.x>.
- (3) Hajishengallis, G.; Korostoff, J. M. Revisiting the Page & Schroeder Model: The Good, the Bad and the Unknowns in the Periodontal Host Response 40 Years Later. *Periodontol.* **2000** **2017**, *75* (1), 116–151. <https://doi.org/10.1111/prd.12181>.
- (4) Khodadadi, N.; Khodadadi, M.; Zamani, M. Is Periodontitis Associated with Obstructive Sleep Apnea? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Exp. Dent.* **2022**, *14* (4), 359–365. <https://doi.org/10.4317/jced.59478>.
- (5) Bianchi, G.; de’Angelis, N.; Gavriilidis, P.; Sobhani, I.; de’Angelis, G. L.; Carra, M. C. Oral Microbiota in Obstructive Sleep Apnea Patients: A Systematic Review. *Sleep Breath.* **2022**, No. 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11325->

- 022-02718-8.
- (6) Ralls, F. M.; Grigg-Damberger, M. Roles of Gender, Age, Race/Ethnicity, and Residential Socioeconomics in Obstructive Sleep Apnea Syndromes. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2012**, *18* (6), 568–573. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328358be05>.
 - (7) West, S. D.; Turnbull, C. Obstructive Sleep Apnoea. *Eye* **2018**, *32*, 889–903. <https://doi.org/10.1038/s41433-017-0006-y>.
 - (8) Tellez Corral, M. A.; Herrera Daza, E.; Cuervo Jimenez, H. K.; Arango Jimenez, N.; Morales Vera, D. Z.; Velosa Porras, J.; Latorre Uriza, C.; Escobar Arregoces, F. M.; Hidalgo Martínez, P.; Cortes, M. E.; Roa Molina, N. S.; Otero Mendoza, L. M.; Parra Giraldo, C. M. Patients with Obstructive Sleep Apnea Can Favor the Predisposing Factors of Periodontitis by the Presence P. Melaninogenica and C. Albicans, Increasing the Severity of the Periodontal Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *Sept.*, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.934298>.
 - (9) Chen, Y.; Chen, X.; Huang, X.; Duan, Y.; Gao, H.; Gao, X. Analysis of Salivary Microbiome and Its Association With Periodontitis in Patients With Obstructive Sleep Apnea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11* (December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.752475>.
 - (10) Nizam, N.; Tasbakan, M. S.; Basoglu, O. K.; Lappin, D. F.; Buduneli, N. Is There an Association between Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Periodontal Inflammation? *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20* (4), 659–668. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1544-y>.
 - (11) Fischer, R. G.; Lira Junior, R.; Retamal-Valdes, B.; de Figueiredo, L. C.; Malheiros, Z.; Stewart, B.; Feres, M. Periodontal Disease and Its Impact on General Health in Latin America. Section V: Treatment of Periodontitis. *Braz. Oral Res.* **2020**, *34*, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2020.VOL34.0026>.
 - (12) Stefano, M. Di; Polizzi, A.; Santonocito, S.; Romano, A.; Lombardi, T.; Isola, G. Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis : A Critical Review on Prevention and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (5142), 1–14.
 - (13) Szulc, M.; Zakrzewska, A.; Zborowski, J. Local Drug Delivery in Periodontitis Treatment : A Review of Contemporary Literature. *Dent. Med. Probl.* **2018**, *55* (3), 333–342. <https://doi.org/10.17219/dmp/94890>.
 - (14) Graziani, F.; Karapetsa, D.; Alonso, B.; Herrera, D. Nonsurgical and Surgical Treatment of Periodontitis: How Many Options for One Disease? *Periodontol. 2000* **2017**, *75* (1), 152–188. <https://doi.org/10.1111/prd.12201>.
 - (15) Martin, C.; Low, W.; Gupta, A.; Amin, M.; Radecka, I.; Britland, S.; Kenward, K. Strategies for Antimicrobial Drug Delivery to Biofilm. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21* (1), 43–66. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905123529>.
 - (16) Magalhães Dias, A.; Gontijo da Silva, F.; de Figueiredo Monteiro, A. P.; Pinzón-García, A. D.; Sinisterra, R. D.; Cortés, M. E. Polycaprolactone Nanofibers Loaded Oxytetracycline Hydrochloride and Zinc Oxide for Treatment of Periodontal Disease. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *103* (July 2018), 109798. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109798>.
 - (17) Piñon-Segundo, E.; Mendoza-Muñoz, N.; Quintanar-Guerrero, D. Nanoparticles as Dental Drug-Delivery Systems. In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*; 2019; pp 567–593. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815886-9.00023-1>.
 - (18) Gao, J.; Chen, S.; Tang, D.; Jiang, L.; Shi, J.; Wang, S. Mechanical Properties and Degradability of Electrospun PCL/PLGA Blended Scaffolds as Vascular Grafts. *Trans. Tianjin Univ.* **2019**, *25* (2), 152–160. <https://doi.org/10.1007/s12209-018-0152-8>.
 - (19) Hamill, R. J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* **2013**, *73* (9),

- 919–934. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0069-4>.
- (20) Millsop, J. W.; Fazel, N. Oral Candidiasis. *Clin. Dermatol.* **2016**, *34* (4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>.
- (21) Quindós, G.; Gil-Alonso, S.; Marcos-Arias, C.; Sevillano, E.; Mateo, E.; Jauregizar, N.; Eraso, E. Management Options for Low-Dose Methotrexate-Induced Oral Ulcers: A Systematic Review. *Med. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal* **2019**, *24* (2), e172–e180. <https://doi.org/10.4317/medoral.22978>.
- (22) Valentín, A.; Cantón, E.; Pemán, J.; Quindós, G. In Vitro Activity of Amphotericin B and Anidulafungin against *Candida* Spp. Biofilms. *Rev. Iberoam. Micol.* **2007**, *24* (4), 272–277. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70055-4](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70055-4).
- (23) Gifford, J. L.; Hunter, H. N.; Vogel, H. J. Lactoferricin : A Lactoferrin-Derived Peptide with Antimicrobial , Antiviral , Antitumor and Immunological. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2588–2598. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5373-z>.
- (24) Vargas Casanova, Y.; Rodríguez Guerra, J. A.; Umaña Pérez, Y. A.; Leal Castro, A. L.; Almanzar Reina, G.; García Castañeda, J. E.; Rivera Monroy, Z. J. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules* **2017**, *22* (10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22101641>.
- (25) Vargas-Casanova, Y.; Rodríguez-Mayor, A. V.; Cardenas, K. J.; Leal-Castro, A. L.; Muñoz-Molina, L. C.; Fierro-Medina, R.; Rivera-Monroy, Z. J.; García-Castañeda, J. E. Synergistic Bactericide and Antibiotic Effects of Dimeric, Tetrameric, or Palindromic Peptides Containing the RWQWR Motif against Gram-Positive and Gram-Negative Strains. *RSC Adv.* **2019**, *9* (13), 7239–7245. <https://doi.org/10.1039/c9ra00708c>.
- (26) Román, J. T.; Fuenmayor, C. A.; Dominguez, C. M. Z.; Clavijo-Grimaldo, Di.; Acosta, M.; García-Castañeda, J. E.; Fierro-Medina, R.; Rivera-Monroy, Z. J. Pullulan Nanofibers Containing the Antimicrobial Palindromic Peptide LfcinB (21-25)Pal Obtained: Via Electrospinning. *RSC Adv.* **2019**, *9* (35), 20432–20438. <https://doi.org/10.1039/c9ra03643a>.
- (27) Sevinç, B. A.; Hanley, L. Antibacterial Activity of Dental Composites Containing Zinc Oxide Nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2010**, *94* (1), 22–31. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31620>.
- (28) Allaker, R. P. *Nanoparticles and the Control of Oral Biofilms*; Elsevier Inc., 2012. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-3127-5.00010-6>.
- (29) Cierech, M.; Kolenda, A.; Grudniak, A. M.; Wojnarowicz, J.; Woźniak C, B.; Goła, M.; Swoboda-Kope, E.; Łojkowski, W.; Zbieta Mierzwińska-Nastalska, E. Significance of Polymethylmethacrylate (PMMA) Modification by Zinc Oxide Nanoparticles for Fungal Biofilm Formation. *Int. J. Pharm.* **2016**, *510*, 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.052>.
- (30) Münchow, E. A.; Albuquerque, M. T. P.; Zero, B.; Kamocki, K.; Piva, E.; Gregory, R. L.; Bottino, M. C. Development and Characterization of Novel ZnO-Loaded Electrospun Membranes for Periodontal Regeneration. *Dent. Mater.* **2015**, *31* (9), 1038–1051. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.06.004>.
- (31) Nasajpour, A.; Ansari, S.; Rinoldi, C.; Rad, A. S.; Aghaloo, T.; Shin, S. R.; Mishra, Y. K.; Adlung, R.; Swieszkowski, W.; Annabi, N.; Khademhosseini, A.; Moshaverinia, A.; Tamayol, A. A Multifunctional Polymeric Periodontal Membrane with Osteogenic and Antibacterial Characteristics. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28* (3), 1–8. <https://doi.org/10.1002/adfm.201703437>.

- (32) Sánchez, M. C.; Llama-Palacios, A.; Blanc, V.; León, R.; Herrera, D.; Sanz, M. Structure, Viability and Bacterial Kinetics of an in Vitro Biofilm Model Using Six Bacteria from the Subgingival Microbiota. *J. Periodontal Res.* **2011**, *46* (2), 252–260. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0765.2010.01341.X>.
- (33) Souza, R. O.; Lima, T. H. De; Lambert, R.; Gonzaga, M.; Araújo, D. F.; Aparecida, S.; Moura, D. L.; Rodrigues, G.; Teixeira, J. Amphotericin B-Loaded Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nano Fi Bers : An Alternative Therapy Scheme for Local Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *J. Pharm. Sci.* **2018**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.06.017>.
- (34) Young, T.; Alshanta, O.; Kean, R.; Bradshaw, D.; Pratten, J.; Williams, C.; Woodall, C.; Ramage, G.; Brown, J. Candida Albicans as an Essential “Keystone” Component within Polymicrobial Oral Biofilm Models? *Microorganisms* **2021**, *9* (1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010059>.
- (35) Zupančič, Š.; Preem, L.; Kristl, J.; Putrinš, M.; Tenson, T.; Kocbek, P.; Kogermann, K. Impact of PCL Nanofiber Mat Structural Properties on Hydrophilic Drug Release and Antibacterial Activity on Periodontal Pathogens. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *122* (February), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.024>.
- (36) Zupančič, Š.; Casula, L.; Rijavec, T.; Lapanje, A.; Luštrik, M.; Fadda, A. M.; Kocbek, P.; Kristl, J. Sustained Release of Antimicrobials from Double-Layer Nanofiber Mats for Local Treatment of Periodontal Disease, Evaluated Using a New Micro Flow-through Apparatus. *J. Control. Release* **2019**, *316* (September), 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.008>.
- (37) Mirzaeei, S.; Mansurian, M.; Asare-Addo, K.; Nokhodchi, A. Metronidazole-and Amoxicillin-Loaded Plga and Pcl Nanofibers as Potential Drug Delivery Systems for the Treatment of Periodontitis: In Vitro and in Vivo Evaluations. *Biomedicines* **2021**, *9* (8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080975>.
- (38) Zamani, M.; Morshed, M.; Varshosaz, J.; Jannesari, M. Controlled Release of Metronidazole Benzoate from Poly ϵ -Caprolactone Electrospun Nanofibers for Periodontal Diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *75* (2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.02.002>.
- (39) Ranjbar-Mohammadi, M.; Zamani, M.; Prabhakaran, M. P.; Bahrami, S. H.; Ramakrishna, S. Electrospinning of PLGA/Gum Tragacanth Nanofibers Containing Tetracycline Hydrochloride for Periodontal Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *58*, 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.066>.
- (40) Bottino, M. C.; Arthur, R. A.; Waeiss, R. A.; Kamocki, K.; Gregson, K. S.; Gregory, R. L. Biodegradable Nanofibrous Drug Delivery Systems: Effects of Metronidazole and Ciprofloxacin on Periodontopathogens and Commensal Oral Bacteria. *Clin. Oral Investig.* **2014**, *18* (9), 2151–2158. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1201-x>.
- (41) Budai-Szűcs, M.; Léber, A.; Cui, L.; Józó, M.; Vályi, P.; Burián, K.; Kirschweng, B.; Csányi, E.; Pukánszky, B. Electrospun PLA Fibers Containing Metronidazole for Periodontal Disease. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 233–242. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S231748>.
- (42) Deepak, A.; Goyal, A. K.; Rath, G. Development and Characterization of Novel Medicated Nanofiber for the Treatment of Periodontitis. *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19* (8), 3687–3697. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1177-y>.

4.2 Capítulo 4

Mapeo y prospección tecnológica simplificada del uso de nanofibras con actividad antimicrobiana para el tratamiento de la periodontitis

4.2.1 Mapeo tecnológico

Se realizó una búsqueda del estado de arte (artículos científicos) del uso de nanofibras con actividad antimicrobiana para el tratamiento de periodontitis, con el fin de encontrar nuevas alternativas terapéuticas y oportunidades de desarrollo de tecnologías para el tratamiento de la periodontitis con posibilidades de adaptación al tratamiento de AOS.

Se hizo una búsqueda de la literatura publicada sobre sistemas de liberación controlada de fármacos como nanofibras cargadas con sustancias con actividad antimicrobiana para el tratamiento de la periodontitis en los últimos 20 años, en las bases de datos *Lens.org* y *Scopus*, teniendo en cuenta las palabras clave, Nanofibra, péptido, óxido de zinc, anfotericina B, periodontitis y enfermedad periodontal. Se estableció la siguiente ecuación de búsqueda: (nanofiber* AND ("zinc oxide" OR "ZnO") OR ("LfcinB" OR lactofe*) OR ampho*) AND ("periodontitis" OR "periodontal disease"). Los datos fueron extraídos y sometidos a análisis y visualización en el Software VOSviewer versión 1.6.18.

El mapa de palabras clave refleja la estructura semántica del campo de investigación de interés, a través de los descriptores elegidos por los autores y las revistas científicas. Mediante el software VOSviewer se mide la ocurrencia por palabras citadas por los autores y la fortaleza entre las palabras, según el porcentaje del total de citas de un artículo con respecto al total de todos los artículos encontrados en la base de datos. Las Figura 8 y 9 muestran el mapeo de artículos científicos usando la ecuación de búsqueda mencionada, utilizando las bases de datos *Lens.org*, y *Scopus*.

Usando la ecuación de búsqueda, fueron encontrados 174 artículos científicos en la base de datos *Lens.org*, de los cuales fueron extraídos datos completos de título, nombres de autores, año de publicación, DOI, palabras clave, citas, entre otros datos. A partir del mapa fueron

visualizadas 901 palabras clave, con un mínimo de cinco ocurrencias por palabra citadas por los autores. Las palabras clave fueron agrupadas en “clusters”, diferenciados por colores, mediante el cálculo de frecuencias de co-ocurrencias, de tal forma que permitió la visualización de los flujos con mayor interacción entre los artículos. A mayor tamaño del cluster, mayor frecuencia de las palabras clave. En el mapa analizado se visualizan cinco clusters: 1) Cluster amarillo: asociado al uso de la nanotecnología, nanopartículas y biomateriales en la ingeniería tisular; 2) Cluster azul: asociado a la metodología Electrospinning y su aplicación en regeneración tisular y de hueso en periodontitis; 3) Cluster rojo: asociado a las propiedades químicas y físicas de las nanofibras; 4) Cluster verde: asociado al uso de las nanofibras como sistemas de liberación de sustancias antimicrobianas, como antibióticos; y 5) Cluster morado: asociado a la terapia periodontal en modelo animal (Figuras 8). Se destaca que los flujos de interacción a partir de la palabra clave “periodontitis” se relaciona principalmente con “ingeniería de tejidos”, “regeneración tisular” y “regeneración de hueso” (Figura 9).

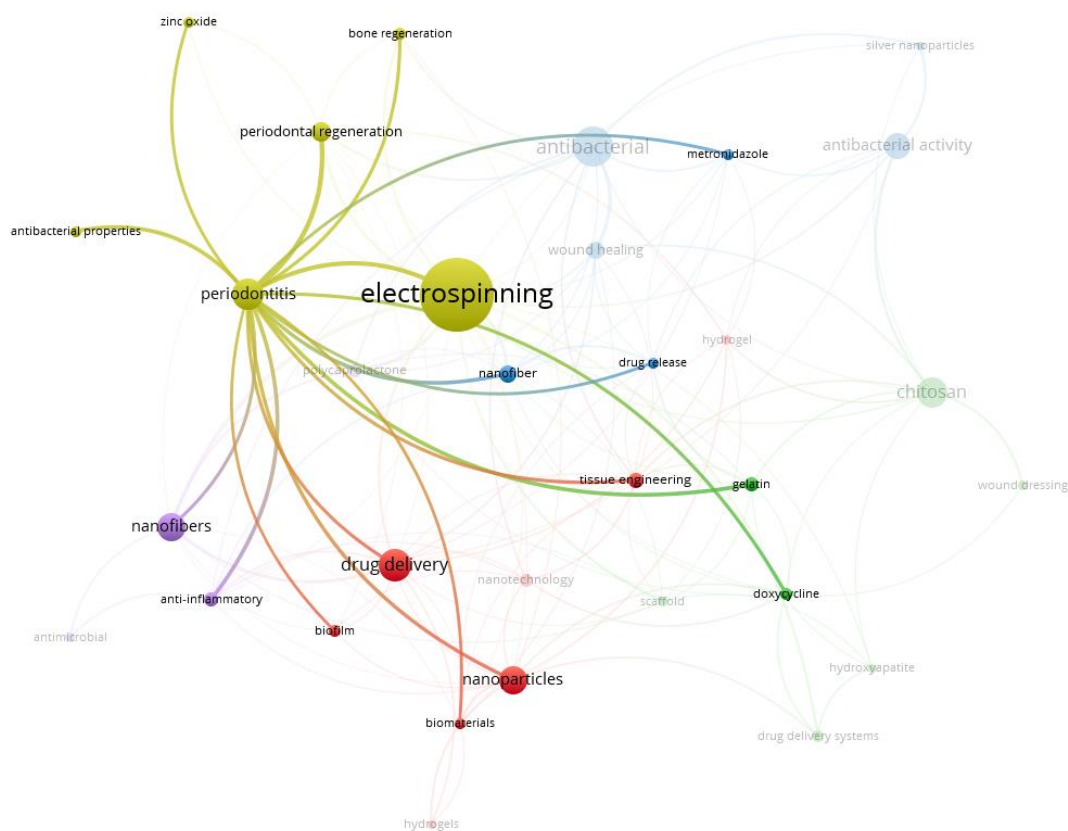


Figura 11. Flujos de interacción a partir de la palabra clave “periodontitis”- *Scopus* (Figura realizada por Téllez M.; Fuente: Software VOSviewer)

La búsqueda realizada en *Lens.org* mostró ampliamente los campos relacionados con el uso de nanofibras en la terapia periodontal, la cual estuvo frecuentemente relacionada con la ingeniería de tejidos y regeneración de hueso. La búsqueda realizada con *Scopus* arrojó mayor cantidad de registros de artículos, enfocados al uso de la técnica Electrospinning para la producción de nanofibras con propiedades regenerativas de tejido y hueso. Se observó menor frecuencia de palabras clave relacionadas con la actividad antimicrobiana, y no fue evidente el uso de los términos como “anti-biofilm”, “antifungals”, “amphotericin B”, “antimicrobial peptides”, “lactoferricin” y “LfcinB”.

B)

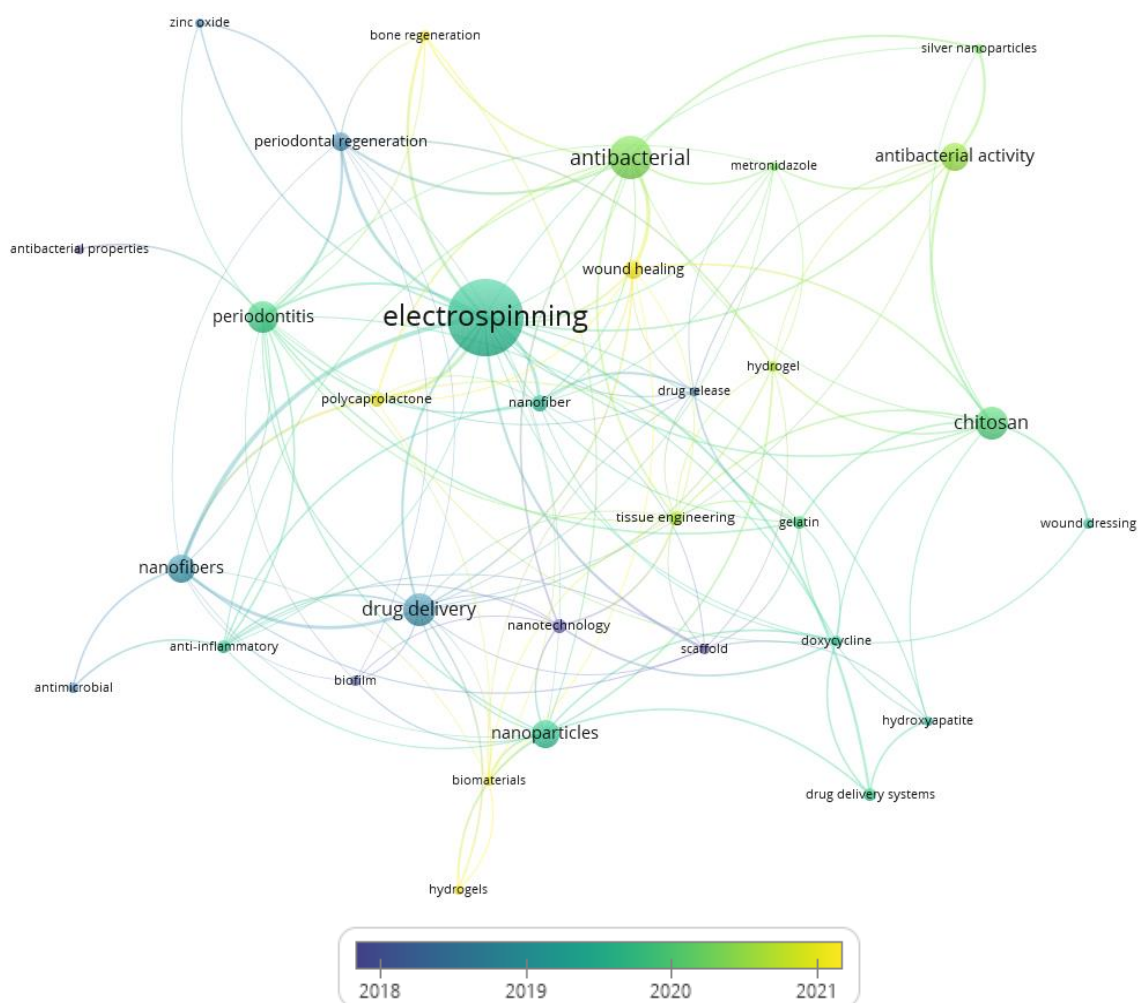


Figura 12. Mapa de palabras clave reportadas en los últimos 6 años.
Base de datos (A) *Lens.org* y (B) *Scopus*
(Figura realizada por Téllez M.; Fuente: Software VOSviewer).

El interés en el campo de investigación se ha incrementado a lo largo del tiempo, sin embargo, ha empezado a decrecer en los últimos 3 años (Figura 13). Reino Unido y Estados Unidos son los países con mayor número de publicaciones en el campo de la investigación; 34 y 30 publicaciones, respectivamente. Brasil y Colombia han reportado once y un estudio, respectivamente (Figura 14). Las instituciones que más han publicado en el área son la Universidad de Sheffield - U.K., Universidad

de Indiana – U.S., Universidad de Ljubljana – Eslovenia y Universidad de Michigan – U.S., cada una con 14, 13, 9 y 5 publicaciones, respectivamente (Figura 15).

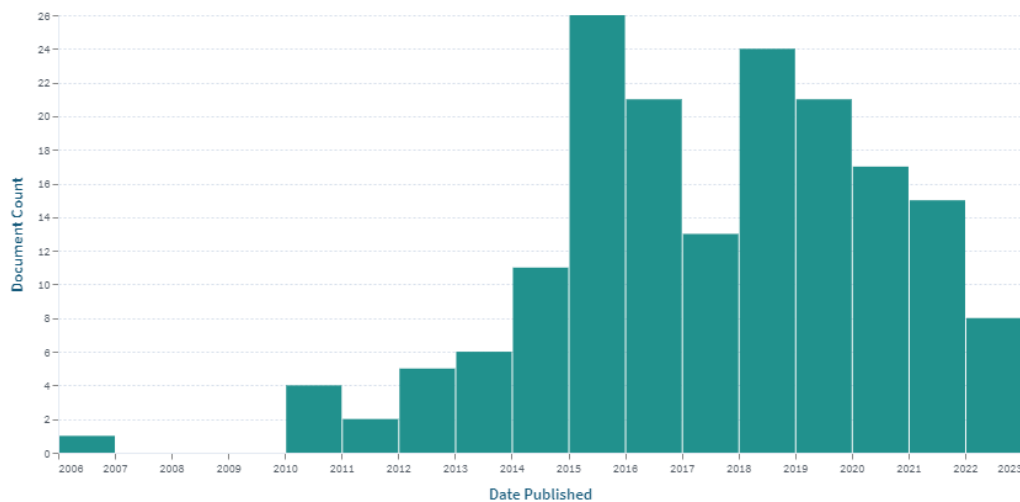


Figura 13. Publicación de artículos a lo largo del tiempo.
(Tomado de *Lens.org*)

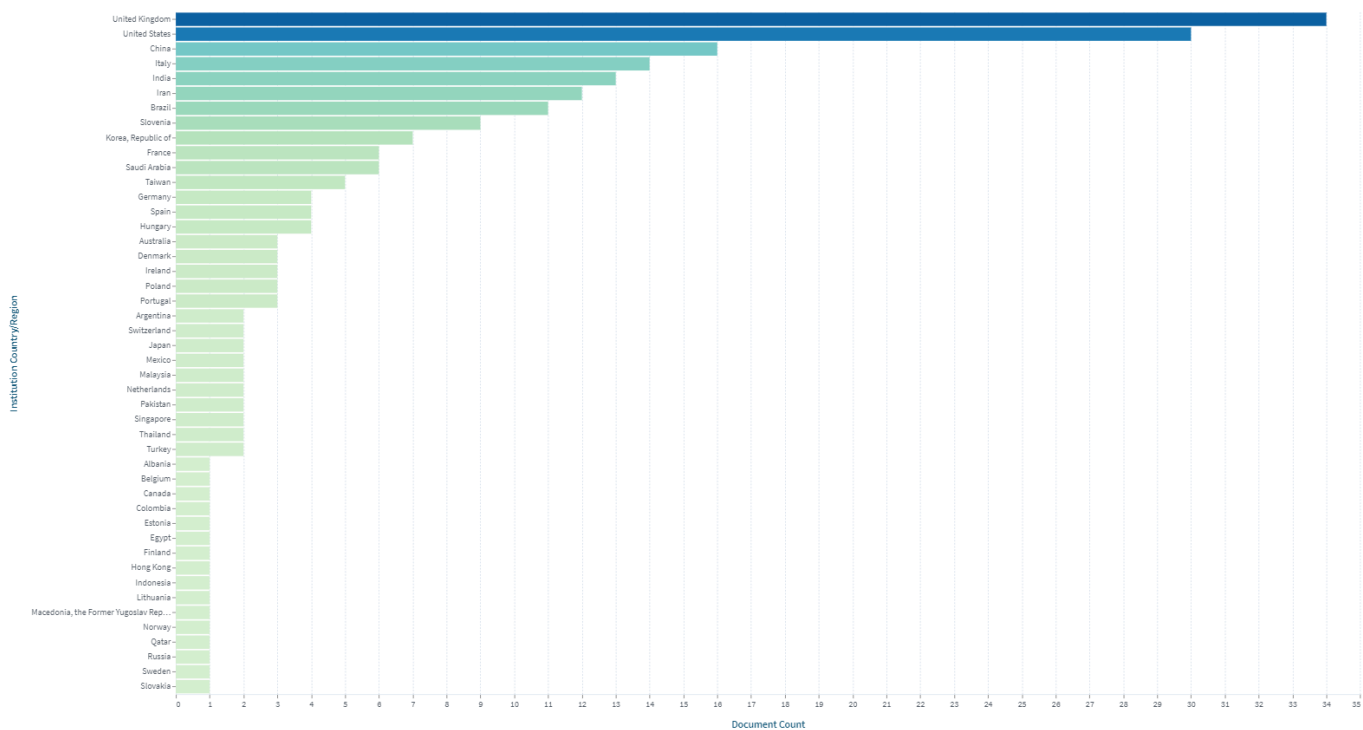


Figura 14. Países más activos según el no. de publicaciones.
(Tomado de *Lens.org*)

2 Amirkabir University of Technology	3 Banaras Hindu University	2 Budapest University of Technology and Economics	2 COMSATS Institute of Information Technology	2 Dankook University
3 French Institute of Health and Medical Research	13 Indiana University – Purdue University Indianapolis	3 Isfahan University of Medical Sciences	3 Kermanshah University of Medical Sciences	3 Mahatma Gandhi University
3 National Taiwan Ocean University	4 Polytechnic University of Turin	3 Sao Paulo State University	3 Teagasc	3 University of Georgia
3 University of Leeds	9 University of Ljubljana	5 University of Michigan	3 University of Milan	14 University of Sheffield

Figura 15. Instituciones relacionadas con el número de publicaciones.
(Tomado de *Lens.org*)

En la tabla 2 se resaltan catorce estudios publicados en los últimos 12 años sobre el uso de las nanofibras como sistemas de liberación controlada de fármacos para la aplicación en la terapia periodontal, con resultados relacionados a la actividad antimicrobiana.

Tabla 2. Artículos que evalúan nanofibras para terapia periodontal

Autores	Polímero usado	Sustancia antimicrobiana	Modelo evaluado	Metodología	Tiempo evaluado	Conclusión
(Zamani et al., 2010).	PCL	Metronidazol (MET)		Evaluaron las propiedades físicas-químicas de las nanofibras	19 días	La conductividad aumenta, mientras que la viscosidad y el diámetro de las nanofibras disminuye al aumentar las concentraciones de metronidazol. Reportaron una liberación sostenida de metronidazol de las nanofibras durante al menos 19 días.
(Verma et al., 2012)	PCL	MET	<i>In vivo</i> : surco gingival de individuos con periodontitis	Medición de parámetros periodontales	15 y 30 días	Las nanofibras con MET sirven como coadyuvante en la terapia de raspado y alisado radicular al disminuir los parámetros periodontales en los individuos con periodontitis crónica.
(Chaturvedi et al., 2013)	PCL	Doxiciclina (DOX)	<i>In vivo</i> : surco gingival de individuos con periodontitis	Medición de parámetros periodontales	15 y 30 días	La combinación de la terapia de alisado y raspado radicular más las nanofibras con DOX mejoran los parámetros periodontales (PD, PI y GI) de los individuos con periodontitis.
(Bottino et al., 2014)	PDS	Ciprofloxacina (CIP) y MET	<i>In vitro</i> : <i>S. salivarius</i> (S.s) y <i>L. casei</i> (L.c) (biopelícula). <i>F. nucleatum</i> (F.n) y <i>A.a</i>	Viabilidad biopelículas de <i>S.s</i> y <i>L.c</i> sobre la nanofibras. Difusión en disco sobre <i>F. n</i> y <i>A.a</i>	4 días	No se detectó ningún efecto inhibitorio de los antibióticos probados sobre la formación de biopelículas de las bacterias orales comensales. Las nanofibras que contenían CIP inhibieron el crecimiento de <i>F. nucleatum</i> y <i>A.actinomyctemcomitans</i> (A.a). El porcentaje de liberación de CIP fue mayor (>90%) a los 7 días.
(Münchow et al., 2015)	PCL y PCL/Gel (Gelatina tipo B de piel bovina)	ZnO	<i>In vitro</i> : <i>P. gingivalis</i> (P.g) y <i>F. n</i>	Difusión en disco	5 días	El ZnO en nanofibras de PCL/Gel puede ser útil para la inhibición de bacterias periodontopatógenas e incluso pueden aplicarse potencialmente para la regeneración de tejido y hueso, debido al estímulo de la viabilidad de células madre de pulpa dental
(Ranjbar-Mohammadi et al., 2016)	PLGA-Goma tragacanto (GT)	Clorhidrato de tetraciclina (OTC)	<i>In vitro</i> : <i>S. aureus</i> (S.a) y <i>P. aeruginosa</i> (P.a)	Difusión en disco.	24 horas	Las nanofibras inhibieron el crecimiento de <i>S. aureus</i> . La tasa de liberación de tetraciclina de las nanofibras de PLGA-GT aumentó con el incremento de la proporción de GT, y fue prolongada hasta por 75 días

(Deepak et al., 2018)	PVA-HA	MET y MET-plata	<i>In vitro:</i> <i>P. a.</i> <i>In vivo:</i> Surco gingival de ratas infectadas con <i>P. a</i>	Conteo de UFC/MI	<i>In vitro:</i> 24, 48 y 72 horas. <i>In vivo:</i> 2, 4 y 7 días	El complejo metronidazol-plata con la matriz polimérica tienen una liberación <i>in vitro</i> constante. Los estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> muestran una actividad antimicrobiana de amplio espectro del complejo MET-plata y se demostró el potencial de la hidroxiapatita para rellenar los defectos periodontales.
(Zupančič et al., 2018)	PCL	MET, CIP y MET-CIP	<i>In vitro:</i> <i>E. coli</i> (E.c), <i>S. mutans</i> (S.m), <i>A.a</i> , <i>F.n</i> y <i>P.g</i>	Difusión en disco	1-5 días	La hidrofobicidad de las nanofibras de PCL y su espesor son las características clave en la liberación prolongada de fármacos hidrofílicos. La liberación del MET se incrementó en las nanofibras con ambos antibióticos, las cuales mostraron mayor espectro de acción antibacteriana comparada a la acción de los antibióticos individuales.
(Magalhães Dias et al., 2019)	PCL	OTC y OTC con ZnO (OTCz)	<i>In vitro:</i> Cultivo mixto de <i>A.a</i> , <i>F.n</i> , <i>P.g</i> y <i>P. intermedia</i> (P.i)	Difusión en disco y Microdilución en caldo	24 y 48 horas	Las nanofibras de PCL con OTC y ZnO fueron más efectivas en la liberación de la OTC de manera sostenida hasta por 5 días. Sin efectos citotóxicos sobre células fibroblásticas y con actividad antimicrobiana contra el cultivo bacteriano mixto.
(Zupančič et al., 2019)	Quitosán-Óxido de polietileno (POE) y PCL	CIP y MET	<i>In vitro:</i> <i>E.c</i> y <i>A.a</i>	Difusión en disco	24 horas	Liberación sostenida de CIP y MET partir de nanofibras de doble capa permitió la inhibición del crecimiento de las bacterias evaluadas.
(Budai-Szűcs et al., 2020)	PLA	MET	<i>In vitro:</i> <i>F.n</i> , <i>P. micra</i> (P.m), <i>E. corrodens</i> (E.co), <i>A.a</i> y <i>P.i</i>	Difusión en disco	Cada 24 horas por 14 días	Las nanofibras fueron efectivas para inhibir el crecimiento de las bacterias, siendo más efectiva y prolongada la inhibición de las bacterias sensibles al antibiótico (<i>F. nucleatum</i> y <i>P. intermedia</i>) hasta por 13 días.
(Mirzaeei et al., 2021)	PCL-PLGA	MET y Amoxicilina (AMX)	<i>In vitro:</i> <i>E.c</i> y <i>S.a.</i> Ensayo de liberación <i>In vivo:</i> Implantación subcutánea de las nanofibras en las ratas.	<i>In vitro:</i> Difusión en disco. <i>In vivo:</i> análisis de nanofibras por HPLC. Análisis de tejido subcutáneo tratado con las nanofibras	<i>In vitro:</i> 24 horas. <i>In vivo:</i> 1-14 días	Las nanofibras con ambos antibióticos tuvieron actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> . Las nanofibras pudieron liberar su contenido de fármaco de manera controlada y manteniendo una concentración adecuada liberada durante un período de 7 a 10 días en un modelo animal.

(Ho et al., 2021)	PDLLA	AMX	<i>In vitro:</i> <i>S. sanguinis</i> (S.sa) y P.g. <i>In vivo:</i> ratas con ligadura por 7 días	<i>In vitro:</i> Microdilución en caldo. <i>In vivo:</i> Análisis de tejido gingival tratado con las nanofibras	<i>In vivo:</i> 24 horas y 5 días. <i>In vitro:</i> 4 y 7 días	Las nanofibras de PDLLA-AMX inhibieron el crecimiento de <i>S. sanguinis</i> y <i>P. gingivalis</i> . Promovieron la viabilidad de las células de ligamento periodontal. En el modelo animal, las nanofibras de PDLLA-AMX redujeron la inflamación y aceleraron la reparación periodontal por el estímulo de la expresión de Colágeno tipo I en una etapa temprana.
(Di Cristo et al., 2022)	PLA	Quercetina: flavonoide	<i>In vitro:</i> P.a, S.m. y Biopelícula	Microdilución en caldo. Ensayo con cristal violeta y ensayo colorimétrico MTT	9, 24, 48 y 96 horas.	Las nanofibras de PLA-Quercetina inhibieron el crecimiento de <i>S. mutans</i> , mas no de <i>P. aeruginosa</i> . La actividad anti-biopelícula fue demostrada al inhibir la formación de la biopelícula de cada bacteria después de 9 horas de incubación, con una reducción en la viabilidad de las biopelículas en un 50%. La actividad antimicrobiana se acompañó con la actividad antiinflamatoria, demostrada mediante la disminución de la expresión de marcadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α en células Fibroblastos gingivales humanos

Doce artículos evaluaron antibióticos de amplio espectro como sustancia antimicrobiana, uno evaluó ZnO y otro evaluó Quercetina, ninguno artículo evaluó antifúngicos o péptidos antimicrobianos. Un artículo sólo evaluó las propiedades físico-químicas de las nanofibras y no evaluó actividad antimicrobiana. Ocho artículos evaluaron PCL como el polímero de elección para realizar las nanofibras. Todos los artículos refieren una constante y prolongada liberación controlada de las sustancias antimicrobianas. Dos artículos determinaron si las nanofibras mejoraron los parámetros periodontales en individuos con periodontitis. Tres artículos utilizaron un modelo *in vivo* en ratas, dos de ellos evaluaron tejido gingival y uno evaluó citotoxicidad subcutánea. Ocho artículos usaron Difusión en disco, como el principal método para evaluar la actividad antimicrobiana de las nanofibras. A pesar que todos los artículos hicieron referencia al uso de las nanofibras para la terapia periodontal, solo dos artículos evaluaron la formación de biopelículas, sin embargo, ninguno utilizó un modelo de biopelícula polimicrobiano con bacterias periodontopatógenas y levaduras.

4.2.2 Prospección tecnológica

Las tecnologías de administración de fármacos basadas en nanofibras, se han convertido en alternativas promisorias en el ámbito odontológico para proporcionar terapias antimicrobianas con concentraciones adecuadas de fármacos, dirigidos directamente al sitio de acción como el tejido periodontal. Entre los materiales de mayor interés para fabricar las nanofibras se encontró el polímero PCL junto a antibióticos de amplio espectro, como sustancias antimicrobianas de elección. Con el objetivo de evaluar el potencial tecnológico y describir el grado de madurez de las actuales innovaciones relacionadas con la fabricación de nanofibras para la aplicación en la terapia periodontal, fue realizado un estudio de prospección tecnológica de las nanofibras como sistema de liberación controlada de sustancias antimicrobianas, utilizando una plataforma internacional paga para la búsqueda y análisis de patentes *Orbit Intelligence*. Los parámetros de búsqueda se registraron en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de búsqueda de patentes

Parámetros de búsqueda	Datos
Ecuación de búsqueda	"nanofiber" OR "electrostatic" "spinning" OR "electrospinning" AND "periodontitis"
Base de datos	<i>Orbit Intelligence</i>
Intervalo de tiempo	2002-2022
Tipo de documentos	Patentes
Fecha de búsqueda	Noviembre 22 de 2022
Resultados	191 familias de patentes

En la figura 16 se ilustra la evolución de las aplicaciones o depósitos de las patentes en los últimos 20 años, indicando la dinámica de inventiva del uso de nanofibras en la periodontitis. Entre los años 2003 y 2012 se observa una tendencia en el aumento exponencial de los depósitos de patentes indicando que se inició la exploración de tecnologías relacionadas con las nanofibras. Entre los años 2015 y 2018 se observa una estabilización del número de depósitos de patentes, que puede estar explicado por la estabilización de los presupuestos de I+D, lo que conduce a un flujo de solicitudes de patentes más o menos constante sin demasiada selectividad en la solicitud de patentes. En el año 2019 hay un incremento sustantivo en el depósito de las patentes, sin

embargo, se hace evidente que a partir de 2020 hay una disminución en el número de patentes registradas, que puede estar asociada a la disminución sustancial en los presupuestos de I+D o propiedad intelectual. Además de esto, debido a la pandemia se puede inferir que parte de los recursos fueron utilizados para suplir las demandas que acarreo la pandemia que comenzó en este año.

Es así que en los últimos 20 años se evidenciaron diferentes tipos de perfiles relacionados con el interés del uso de nanofibras en la periodontitis. El sector con un crecimiento exponencial fue indicativo de la competitividad para depositar una patente. El sector con crecimiento lineal mostró un interés continuo de los solicitantes en el campo y es un signo de madurez del campo de invención. Por el contrario, la disminución del número de solicitudes presentadas, fue indicativo de la desvinculación de los solicitantes en el campo. Vale aclarar que los picos y valles en el número de solicitudes presentadas, pueden estar relacionados a los presupuestos de I+D o cambios económicos.

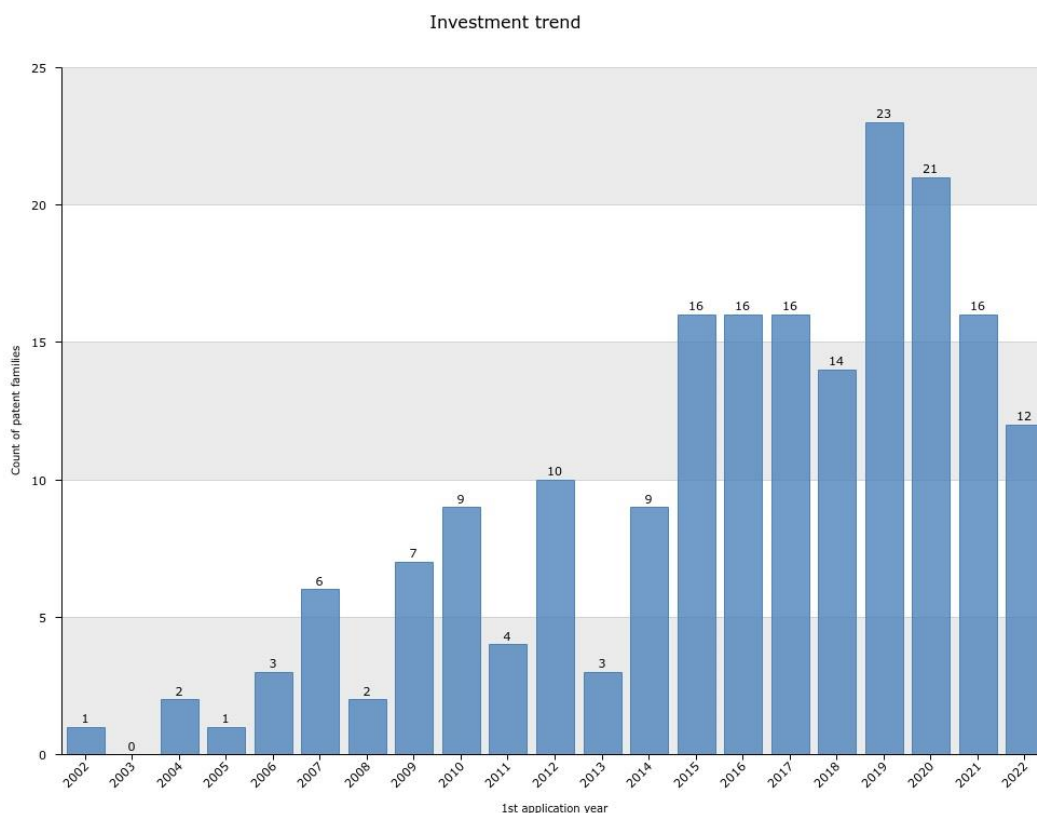


Figura 16. Depósito de patentes en los últimos 20 años.
(Tomado de Questel by *Orbit Intelligence*)

Se identificaron los solicitantes que ya se retiraron del sector por abandono o caducidad de las patentes, y aquellos que aún están activos con solicitudes y/o patentes concedidas aún vigentes (Figura 17). Los principales aplicantes con solicitudes y/o patentes concedidas son instituciones universitarias como la *Universidad de Michigan*, *Dartmouth College*, *MIT*, *Universidad de California* y *Universidad Zhejiang*. En cuanto a empresas privadas, se destaca *Credentis* por ser la principal compañía con solicitudes y patentes concedidas. Esta compañía suiza desarrolla y comercializa nuevos sistemas de remineralización de esmalte y dentina para el tratamiento de lesiones de caries y enfermedades relacionadas.

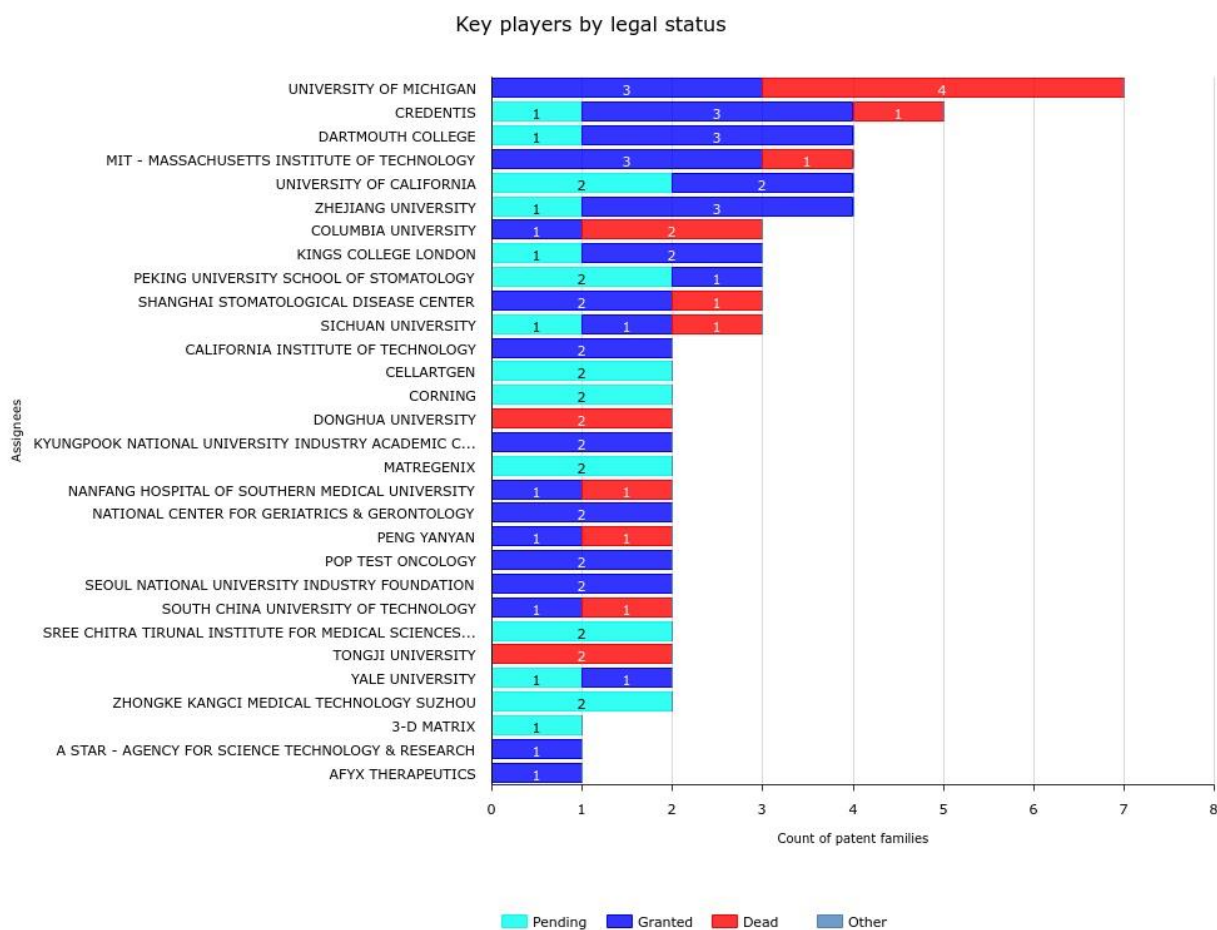


Figura 17. Principales solicitantes según el estado legal de las patentes.
(Tomado de Questel by *Orbit Intelligence*)

Fueron identificados los principales países depositantes de patentes, donde se resalta China (69) y Estados Unidos (66), como los mayores depositantes de las familias de patentes a nivel mundial. Brasil (11), Mexico (11), Chile (3) y Colombia (3) son los países latinoamericanos con mayores depósitos de patentes. Se demuestra la estrategia de protección de los solicitantes, permitiendo identificar los mercados objetivo que deben protegerse (Figura 18).

Markets & competitors location

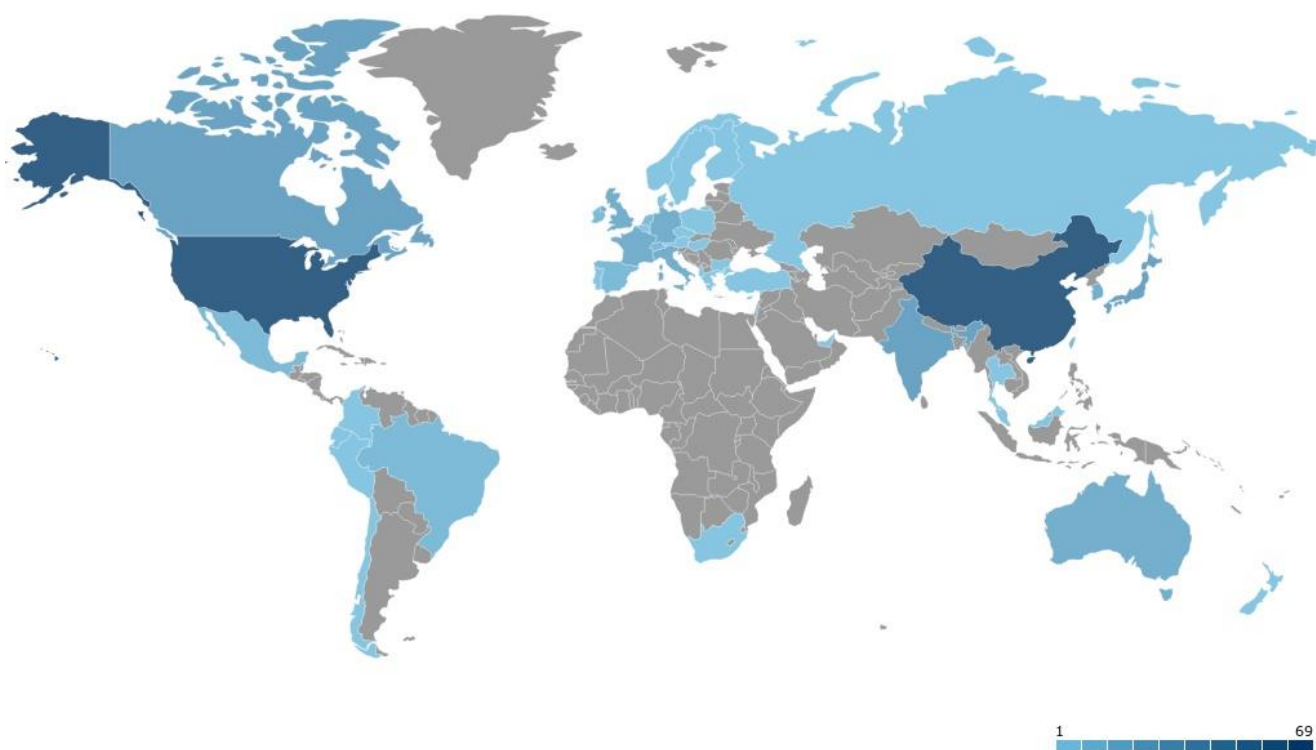


Figura 18. Patentes activas protegidas en las distintas Oficinas nacionales
(Tomado de Questel by *Orbit Intelligence*)

Los principales códigos IPC de las patentes que se analizaron se identifican en la figura 19. Aquí se resaltan las principales tecnologías protegidas en el conjunto de documentos encontrados, de tal forma que permite la identificación de las áreas temáticas en las que se puede buscar protección de las nanofibras para el tratamiento de la periodontitis

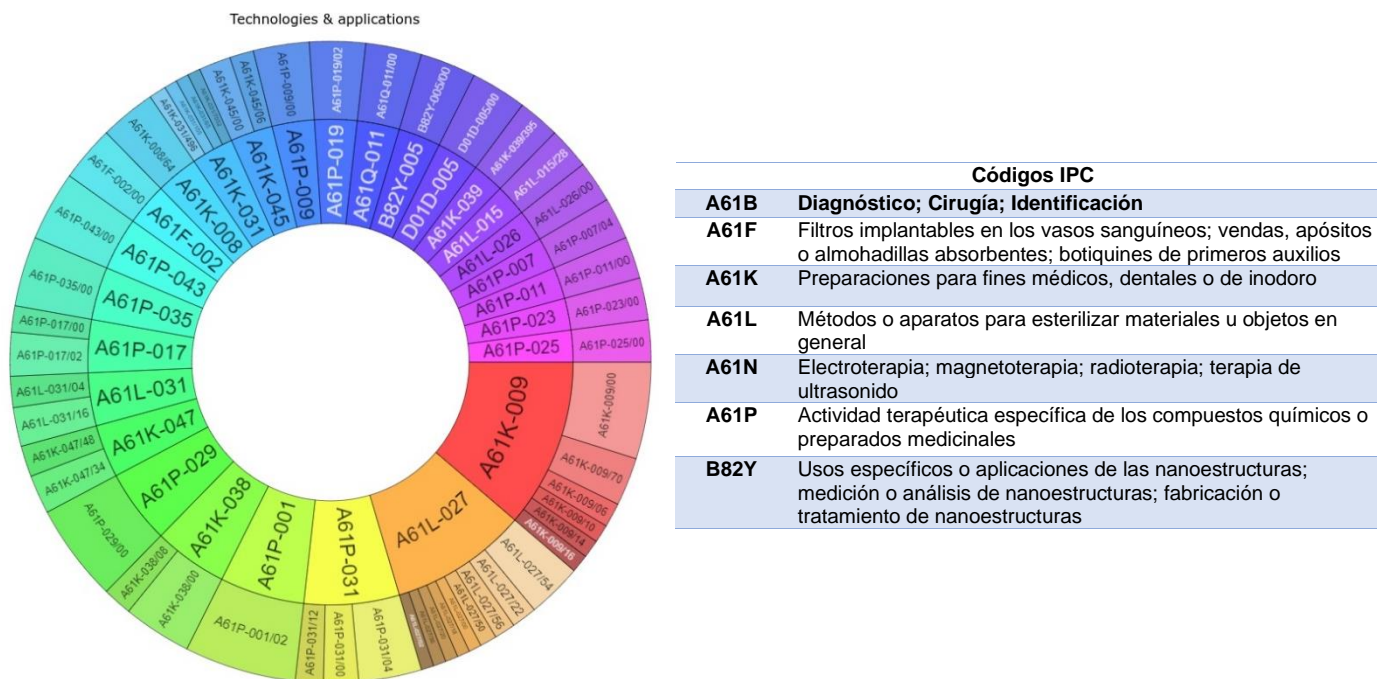


Figura 19. Distribución de los principales códigos IPC contenidos en las patentes (Tomado de Questel by *Orbit Intelligence*)

Análisis tecnológico:

De acuerdo a los resultados de la búsqueda de patentes, no se encontraron registros de nanofibras con AMB, LfcinB (21-25)_{pal} (P61) y ZnO para la inhibición de biopelículas polimicrobianas disbióticas asociadas a la periodontitis, por lo tanto, se establece el siguiente análisis de la tecnología propuesta en esta tesis doctoral, definiendo la idea tecnológica, recurso y beneficios, y sus aspectos innovadores.

Idea tecnológica:

Uso de nanofibras de PCL:PLGA cargadas de AMB, LfcinB (21-25)_{pal} (P61) y ZnO, de liberación sostenida con actividad anti-biopelícula para el tratamiento de la periodontitis.

Recursos y beneficios:

- Actividad antimicrobiana contra biopelículas polimicrobianas disbióticas, con baja actividad citotóxica.
- Protección contra la inactivación de los agentes antimicrobianos en la cavidad oral.
- Eficacia para la administración sostenida de los agentes antimicrobianos *in situ* en la cavidad oral.
- Biocompatibilidad y biodisponibilidad.

Aspectos innovadores de la tecnología:

- Uso sinérgico de la Anfotericina B como un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de bacterias y levaduras, junto a la LfcinB (21-25)_{pal} (P61), péptido antimicrobiano y ZnO como coadyuvante en la inhibición de la biopelícula y liberación sostenida.
- Sistema de liberación adaptable para el tratamiento de la periodontitis *in situ*.



DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

La periodontitis es una enfermedad infecciosa e inflamatoria crónica multifactorial que es causada por la presencia de comunidades microbianas patógenas, denominadas microbiota disbiótica, organizadas en biopelículas polimicrobianas estratificadas (Haffajee et al., 2008; Ximenez-Fyvie et al., 2000b), que provocan una respuesta inflamatoria crónica del tejido periodontal, resultando en la formación de bolsas periodontales, pérdida progresiva de la inserción periodontal con destrucción de los tejidos blandos y duros de soporte periodontal y posterior pérdida de los dientes (Hajishengallis & Korostoff, 2017). En los últimos años, enfermedades y trastornos sistémicos como la apnea obstructiva del sueño (AOS) se han relacionado con la periodontitis (Bianchi et al., 2022; Khodadadi et al., 2022). La AOS es un trastorno respiratorio del sueño, causado por la interacción de factores genéticos con factores anatómicos obstructivos, neuromusculares o inflamatorios que obstruyen las vías respiratorias, bloqueando el paso del aire (Ralls & Grigg-Damberger, 2012). Este trastorno ocurre cuando los tejidos blandos alrededor de la vía aérea superior colapsan, parcial (hipopnea) o completamente (apnea), obstruyendo el flujo de aire a pesar del aumento del esfuerzo ventilatorio (West & Turnbull, 2018).

La prevalencia de la periodontitis y la AOS se ha reportado en diferentes estudios alrededor del mundo desde 2009 hasta el presente año. A pesar que han sido realizados en diferentes zonas geográficas (Australia, Corea, Estados Unidos, Colombia, Turquía, Croacia y Países bajos), reportan resultados similares, al determinar que la periodontitis es común en pacientes que tienen AOS, indicando prevalencias entre el 60 y 96% (Cuervo et al., 2016; Gamsiz-Isik et al., 2017; Gunaratnam et al., 2009; Keller et al., 2013; Sanders et al., 2015; Seo et al., 2013; Verhelst et al., 2022). Además, los estadios III y IV de periodontitis son los más frecuentes en pacientes con AOS severa (Stazić et al., 2022). Estos resultados concuerdan con la condición presentada por los pacientes evaluados en este estudio. El 75% de los pacientes que tenían AOS severa, sufrían de periodontitis estadio III.

Numerosos estudios sistemáticos y de meta-análisis han propuesto varias causas plausibles para la relación entre la periodontitis y la AOS: 1. La hipoxia intermitente puede proporcionar las condiciones para la inflamación sistémica y el estrés oxidativo. 2) La sequedad de la boca provocada por la respiración abierta prolongada, puede impedir que el flujo de saliva limpie la mucosa oral, acelerando el desarrollo de la periodontitis. 3) El pH disminuye, lo que puede estar

fomentando la colonización microbiana y, en consecuencia, el desarrollo y acumulación de placa dental. 4) La composición y la ecología de la microbiota oral pueden verse influenciadas por la inflamación asociada con la AOS y la disminución intermitente de la oxigenación, promoviendo el desarrollo de la periodontitis. Y 5) Tanto la AOS como la periodontitis están asociadas con la inflamación sistémica, otro factor que explicaría la conexión entre estas dos condiciones (Bianchi et al., 2022; Khodadadi et al., 2022).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y la alta prevalencia de periodontitis en pacientes con AOS, el objetivo del presente trabajo fue evaluar un sistema de liberación controlada de fármacos (nanofibras) de un antifúngico, Anfotericina B (AMB), un péptido antimicrobiano palindrómico, Lactoferricina Bovina (LfcinB (21-25)_{pal}), (nombrado “P61”) y óxido de zinc (ZnO) para inhibir la formación de biopelículas polimicrobianas *in vitro* relacionadas con Periodontitis asociada a Apnea Obstructiva del Sueño, con el fin de proponer una alternativa de tratamiento. Para ello, se propuso en una primera fase, caracterizar la microbiota oral de pacientes con periodontitis y con AOS, comparada con aquellos que no tienen estas condiciones, con el fin de establecer un perfil microbiológico, así como, cuantificar y comparar la concentración de citocinas proinflamatorias, con el fin de comprender los posibles mecanismos microbiológicos e inmunológicos involucrados en la relación entre la periodontitis y la AOS. En una segunda fase, el trabajo se enfocó en establecer una biopelícula polimicrobiana *in vitro* relacionada con la microbiota caracterizada en los pacientes con periodontitis y AOS, desarrollar nanofibras como sistemas de liberación controlada de AMB, LfcinB (21-25)_{pal} (P61) y ZnO, para inhibir las biopelículas polimicrobianas establecidas. Y una última fase, fue desarrollada para realizar un análisis tecnológico del uso de las nanofibras cargadas de AMB, LfcinB (21-25)_{pal} (P61) y ZnO para la aplicación en la terapia periodontal en pacientes con AOS.

Los datos clínicos obtenidos de los pacientes evaluados en el presente trabajo, también permitieron conocer como está afectada su salud oral. Entre los parámetros periodontales evaluados se destacó un aumento en el porcentaje de biopelícula en los pacientes con periodontitis, con AOS y con ambas condiciones, respecto a los pacientes sanos ($p < 0.05$), lo que concuerda con la relación significativa entre la presencia de AOS y el porcentaje de biopelícula reportado por Loke y colaboradores en el 2015 ($p = 0.037$) (Loke et al., 2015) y por Gamsiz-Isik y colaboradores en el 2017 ($p < 0.001$) (Gamsiz-Isik et al., 2017). Además, en el presente estudio, la profundidad de sondaje (PD > 4 mm) y el sangrado al sondaje (BOP%) aumentaron significativamente en pacientes que solo tenían AOS en comparación con los pacientes sanos,

resultados similares a los obtenidos por Seo y colaboradores en el 2013, quienes determinaron que la PD >4 mm ($p < 0,005$) y el nivel de inserción clínica (CAL >6 mm) ($p < 0,008$) eran significativamente mayores en pacientes con AOS (Seo et al., 2013). Estas evidencias sugieren que la condición de AOS y su fisiopatología podrían ser un factor de riesgo para la progresión de la periodontitis.

Por otro lado, el perfil microbiológico en la periodontitis está muy bien reconocido por la presencia de bacterias denominadas periodontopatógenas, las cuales pueden desencadenar una respuesta inflamatoria por sí solas, como es el caso de *P. gingivalis* (Lamont et al., 2018). Otras bacterias como *Prevotella intermedia*, *Tanarella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Capnocytophaga* spp. (Colombo & Tanner, 2019; Haffajee et al., 2008; Ximenez-Fyvie et al., 2000b), también son asociadas como bacterias causantes de la periodontitis. Dichas bacterias pueden organizarse en biopelículas, cuya patogenicidad está influenciada por diferentes factores como el microambiente, los factores de virulencia de las bacterias presentes y su abundancia (Ximenez-Fyvie et al., 2000a, 2000b). Para comprender el papel que cumplen estas bacterias en las biopelículas orales, fueron clasificadas en seis complejos microbianos de colores (S. Socransky & Haffajee, 2002): Complejo amarillo: constituido por especies de *Streptococcus*, considerados colonizadores pioneros, anaerobios facultativos, acidófilos y fermentadores lácticos; complejo azul: conformado por especies de *Actinomyces*, íntimamente asociados con el anterior mediante coagregación; Complejo púrpura: comprende bacterias del género *Veillonella*, asociadas a las anteriores, una vez consumido el oxígeno en la biopelícula; Complejo verde: compuesto de anaerobios característicos de biopelículas maduras, que incluye géneros como *Capnocytophaga* spp. y *Eikenella* spp.; Complejo naranja: comprende las bacterias de los géneros *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Campylobacter* spp., *Parvimonas* spp., las cuales ocupan las zonas más profundas de la placa, consideradas bacterias “puente” entre los primeros colonizadores y las bacterias características de biopelículas patógenas maduras; y por último, el complejo rojo: compuesto por *P. gingivalis*, *T. forsythia*, y *T. denticola*, denominadas periodontopatógenas, las cuales son invasivas en contacto con la mucosa oral y están relacionadas estrechamente con la respuesta inflamatoria.

Ahora bien, cada vez emergen nuevos estudios, donde se ha determinado la participación de otros microorganismos en el desarrollo de esta enfermedad, como es el caso de *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Fujii et al., 2009), e incluso levaduras del género *Candida* spp. (Vieira Colombo et al., 2016). Estos

microorganismos no están clasificados en los complejos de colores, ni se ha establecido su papel en la microbiota oral.

La composición de la microbiota oral difiere significativamente entre individuos que tienen AOS y aquellos que no, con la presencia de patógenos periodontales específicos. Los individuos con AOS pueden albergar cantidades más altas de patógenos periodontales, particularmente en AOS severa, en comparación con los individuos sin AOS o con AOS leve/moderada. Esto lo ha demostrado la limitada literatura publicada acerca de la microbiota oral en individuos con AOS, la cual ha determinado la presencia e incremento de géneros periodontopatógenos, como *Fusobacterium*, *Tanarella*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Treponema* e incluso otros géneros como *Neisseria*, *Scardovia* y *Gemella* (X. Chen et al., 2022; Y. Chen et al., 2021; Jia et al., 2020; Ko et al., 2019; Nizam et al., 2016). A partir de estos hallazgos se sugiere que la AOS y sus condiciones como la respiración por la boca y la sequedad oral, serían características que podrían contribuir a las diferencias en la ecología microbiana, influyendo en la aparición y/o progresión de enfermedades orales, como la periodontitis. (Nizam et al., 2016).

A pesar de los límites que conlleva el haber realizado la identificación microbiana mediante el uso de MALDI-TOF-MS, que por el cual solo se identifican microorganismos cultivables, es importante destacar que los resultados del presente estudio, son comparables y soportan la hipótesis que la AOS influye en la colonización de una microbiota disbiótica potencialmente infecciosa en la cavidad oral, como otros autores lo plantean según sus resultados.

Es así que, en la primera fase del presente trabajo, para facilitar la caracterización de la microbiota oral en pacientes con periodontitis y con AOS, se realizó un análisis agrupando los microorganismos identificados en los complejos microbianos establecidos por Socransky, adicionando tres categorías *Candida* spp., *Lactobacillus* spp. y Otros microorganismos o “microorganismos crípticos”, los cuales rara vez se consideran patógenos orales significativos y no se han categorizado previamente, ni están conectados con enfermedades en la cavidad oral. Se logró determinar una mayor frecuencia relativa de los complejos de microbianos, Amarillo, Azul, Verde, Naranja y Rojo en la placa subgingival y del complejo Púrpura, *Candida* spp, *Lactobacillus* spp. y otros microorganismos en saliva; resultados que concuerdan con el modelo de biopelícula establecido por diferentes autores (Haffajee et al., 2008; Lasserre et al., 2018), donde hay mayor presencia de microorganismos anaerobios estrictos en la placa dental, en procesos infecciosos como la periodontitis, favorecidos por el aumento de los niveles CO₂.

Aunque se evidenció que los complejos y categorías de microorganismos están en todos los grupos de pacientes evaluados, se destacó una mayor diversidad microbiana en los pacientes que sufren de ambas condiciones, con diferentes porcentajes de presencia de los microorganismos, incluso con diferencias según la muestra evaluada (saliva, placa subgingival o surco gingival), planteando una posible “modulación” de los microorganismos presentes dependiendo del estado de salud o enfermedad (Curtis et al., 2020; Sigmund S Socransky & Haffajee, 2005). Se concluyó que bacterias periodontopatógenas del complejo naranja, como *Prevotella melaninogenica* y la levadura *Candida albicans*, posiblemente están alterando la microbiota oral cultivable de los pacientes con periodontitis y AOS en términos de diversidad, posiblemente aumentando la gravedad de la enfermedad periodontal. El vínculo entre las levaduras y las bacterias periodontopatógenas podría ayudar a explicar por qué las personas con AOS severa tienen un riesgo tan alto de periodontitis estadio III. Esto nos lleva a plantearnos una nueva hipótesis y es que en presencia de ambas condiciones, *C. albicans* pueda ser más patógena (Kuriyama et al., 2003) y tener un comportamiento que permita la colonización de dichas bacterias periodontopatógenas, como se demuestra en estudios *in vitro*, donde esta levadura modula el microambiente, generando ambientes anóxicos, favoreciendo el crecimiento de bacterias anaerobias estrictas y promoviendo sinérgicamente la formación de biopelículas disbióticas (Diaz et al., 2012; Fox et al., 2014; Sztukowska et al., 2018)

Adicionalmente, el presente estudio reveló la existencia de microorganismos crípticos y confirma que algunos de ellos están conectados a un perfil microbiano de salud mientras que otros están más conectados a un perfil microbiano de enfermedad. Mientras que *Gemella* spp. se relacionó a un perfil sano, *Cutibacteria* spp. (Bernard et al., 2018), *Propionibacterium* spp (Emery et al., 2017; Leheste et al., 2017) y *Bifidobacterium* spp (Wu et al., 2020) estaban relacionados a los perfiles de enfermedad, periodontitis y AOS. Se descubrió que el perfil de la enfermedad contenía microorganismos que podrían clasificarse como posibles patógenos y pueden tener un papel en la interacción entre la AOS, la periodontitis y otros trastornos crónicos clínicamente significativos o enfermedades infecciosas sistémicas, los cuales han sido previamente propuestas como factores de riesgo comunes para periodontitis y AOS. No obstante, comprender la función de los posibles patógenos en la microbiota oral requerirá más investigación.

En cuanto al perfil inflamatorio de los pacientes con periodontitis y AOS, se determinó un aumento de la IL-1 β y IL-6 en saliva de pacientes con periodontitis y ambas condiciones, datos similares fueron reportados por Nizam y colaboradores en 2014 (Nizam et al., 2014). Estos datos se

correlacionaron positivamente con el índice de placa (PI) en los pacientes con ambas condiciones, y el BOP% y el PI en pacientes que solo tienen AOS. También se evidenció un aumento de la IL-6 en FCG en pacientes con solo AOS y con ambas condiciones. Cabe resaltar que este es el primer reporte del aumento de IL-6 en FCG de pacientes con periodontitis y AOS. Datos que complementan los resultados del aumento de IL-1 β en FCG, reportados por Gamsiz-Isik (Gamsiz-Isik et al., 2017).

Al mismo tiempo, el presente estudio reporta por primera vez altas concentraciones de IL-17A en FCG en pacientes con AOS, y con periodontitis y AOS, con una correlación positiva con PD y BOP% en ambos grupos de pacientes. La IL-17A es secretada por las células T helper-17 (células TH17), que tienen una acumulación oral homeostática en presencia de IL-6. Sin embargo, la proliferación de células TH17 asociada a la periodontitis requiere de IL-6 e IL-23 (Dutzan et al., 2018) para aumentar la producción de IL-17A. Esta citocina tiene potentes propiedades osteoclastogénicas e inflamatorias de destrucción ósea debido a su capacidad para estimular la expresión de RANKL en los osteoblastos porque media en la destrucción del tejido conectivo al inducir la expresión de las metaloproteinasas de matriz -3, -9 y -13 (MMP-3, 9, 13) en fibroblastos (Hajishengallis & Korostoff, 2017).

Es importante destacar, que diferentes estudios han demostrado un aumento significativo de los niveles de IL-23 en suero de pacientes con solo AOS, y esta tiene una correlación positiva con el IAH y la proteína C reactiva (PCR) (Can & Guven, 2016; Huang et al., 2016), lo que sugiere que niveles elevados de IL-23 en los pacientes con AOS podrían estimular la producción de citocinas proinflamatorias por parte de las células TH17, como la IL-17A, que está involucrada en el desarrollo de la periodontitis (Dutzan et al., 2018).

Además, el presente estudio encontró concentraciones más bajas de IL-33 en saliva en todos los grupos de pacientes, mientras que Nizam y colaboradores (2014) encontraron que las concentraciones de IL-33 en saliva eran más altas en pacientes con AOS, independientemente de la gravedad de la AOS (Nizam et al., 2014). Sin embargo, los niveles de IL-33 en GCF en el presente estudio fueron mayores en pacientes con AOS y con ambas condiciones, con correlaciones positivas con parámetros periodontales en PD en AOS y PD y BOP% en periodontitis y AOS. En la periodontitis, la expresión de IL-33 en las células epiteliales gingivales y del tejido conjuntivo actúa como una alarma del daño tisular para el sistema inmunitario, induciendo la expresión de RANKL y desencadenando el reclutamiento de células B y T que

expresan RANKL (Lapérine et al., 2016; Medara et al., 2021). Sozer y colaboradores (2018) reportaron concentraciones séricas de IL-33 significativamente más altas en pacientes con AOS, y plantearon la hipótesis de que la AOS influye en los niveles de IL-33 y está involucrada en la inflamación sistémica producida en la AOS (Sozer et al., 2018). De igual forma, Nizam y colaboradores (2014) también han demostrado niveles elevados de IL-33 en saliva de pacientes con AOS (Nizam et al., 2014). Estos hallazgos pueden ayudar a explicar la relación bidireccional entre la periodontitis y la AOS, que resulta de su comorbilidad, donde la presencia de una condición puede causar que la otra se vuelva más inflamatoria. Ambas condiciones aumentan la presencia de IL-17A e IL-33, las cuales activan la osteoclastogénesis mediada por el eje RANKL/OPG, provocando la reabsorción ósea periodontal (Patil & Desai, 2014; Sirisereepap et al., 2022).

Con respecto a los niveles de TNF- α en AOS, investigaciones anteriores encontraron que tanto los pacientes con AOS como los individuos sanos tenían las mismas cantidades de TNF- α en FCG (Gamsiz-Isik et al., 2017), saliva (Nizam et al., 2016) y plasma (Huang et al., 2016). Por el contrario, otra investigación encontró una fuerte relación entre el TNF- α y los indicadores de la gravedad de la AOS y la desaturación de oxígeno, entre los pacientes con AOS recientemente diagnosticados (Minoguchi et al., 2004; Wali et al., 2021). Según los hallazgos actuales, con la excepción de las personas que solo tenían periodontitis, los pacientes con AOS y con ambas condiciones tenían niveles igualmente bajos de TNF- α en la saliva. Por el contrario, los niveles de TNF- α en FCG fueron más altos en pacientes sanos. Dada la doble función del TNF- α como mediador inflamatorio, estos hallazgos muestran que aún existe una discrepancia en la determinación de los niveles de TNF- α en pacientes con periodontitis asociada a AOS. Esta discrepancia puede explicarse por variaciones en las características demográficas y clínicas de los individuos. Por lo tanto, se requieren más investigaciones para establecer un vínculo entre los niveles de TNF- α en saliva, FCG, suero y la condición periodontal en AOS evaluados simultáneamente en los mismos pacientes.

Es así que IL-1 β , IL-6, IL-17A, e IL-33 pueden considerarse biomarcadores de ambas condiciones, destacando la asociación entre IL-33 y periodontitis en estadio IV. Nuestros resultados sugieren que existe un diagnóstico potencial de asociación entre individuos con AOS y periodontitis. Las personas con AOS deberían someterse a un examen periodontal periódico; y las personas con periodontitis deberían hacerse un estudio del sueño para determinar la AOS.

Ahora bien, la presencia de *Candida* spp. en la microbiota oral de los pacientes con periodontitis y AOS (Tellez Corral et al., 2022) bien podría ser responsable de los altos niveles de IL-17A e IL-33 en FCG, empeorando la enfermedad periodontal. Estudios previos han informado el papel de la IL-17A y la IL-33 en respuesta a infecciones sistémicas por *Candida albicans*, promoviendo la inmunidad antifúngica (Conti & Gaffen, 2015; Park et al., 2016); sin embargo, otros autores han descrito la función proinflamatoria de estas citocinas, demostrando cómo la IL-33 estimula la producción de otras citocinas como IL-1 β e IL-6 (Gabryelska et al., 2019), y cómo la presencia de una microbiota disbiótica provoca un aumento de IL-17A, la cual desencadena el proceso osteoclastogénico (Gaffen & Moutsopoulos, 2020).

Es así que, a partir de estos resultados, se desarrolló la segunda fase del presente trabajo, seleccionando un conjunto de microorganismos para establecer una biopelícula polimicrobiana *in vitro* para evaluar nanofibras de PCL/PLGA cargadas de AMB, P61 y ZnO. Se eligieron diez microorganismos: *S. salivarius*, *S. gordonii*, *A. odontolyticus*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *C. albicans*, *L. paracasei* y *C. granulosum*, para obtener biopelículas maduras a las 72 horas, siguiendo los parámetros de Sánchez y colaboradores (Sánchez et al., 2011). Por otro lado, se elaboraron las nanofibras utilizando dos polímeros aprobados por la FDA, reconocidos por ser biodegradables, no tóxicos, biocompatibles, que al ser mezclados presentan mayores propiedades hidrofílicas, con mejores propiedades mecánicas, una mayor eficacia en la liberación controlada de fármacos (Gao et al., 2019; Garzón et al., 2022; Pawlik et al., 2019), y son utilizados en la realización de nanofibras para el tratamiento *in situ* de enfermedades de la cavidad oral, ya que ofrece la posibilidad de recargar varios fármacos o sustancias con actividad biológica, tiene una fácil adaptación en los sitios requeridos, de mejor absorción y adecuadas para las condiciones de la cavidad oral (Y. Wang et al., 2021). Además, su proceso de fabricación es reproducible y de bajo costo (Garzón et al., 2022).

Las nanofibras de PCL/PLGA elaboradas en el presente trabajo, exhibieron un aspecto similar, de textura suave, buena estabilidad mecánica y fácil manipulación, con una estabilidad térmica hasta los 350°C, sin cambios sustanciales al agregarse AMB, o ZnO, resultados similares a los obtenidos por Magalhães et al. y Souza, et al. (Magalhães Dias et al., 2019; Souza et al., 2018). Todas las nanofibras, a excepción de la que contenía P61-ZnO (Nf 4) y AMB-P61-ZnO (Nf 6) mostraron un carácter hidrofílico, posiblemente por la mezcla de P61 e incluso ZnO, el cual ha demostrado disminuir la hidrofobicidad de nanofibras de PCL, a concentraciones de 5 y 15% peso/peso (Münchow et al., 2015). Además, la distribución del diámetro de las nanofibras fue

relativamente homogénea (de 233 a 533 nm). Sin embargo, fueron observados pequeños gránulos, posiblemente formados por la presencia de AMB y P61, como ya fue reportado por Souza y colaboradores, en nanofibras de PLGA con AMB (diámetro promedio: 638 ± 94 nm) y Román y colaboradores, en nanofibras de Pullulan con LfcinB (21-25)_{pal} (200-300 nm) (Román et al., 2019). No obstante, al incorporar ZnO, se redujo el diámetro de fibra promedio, en comparación de las nanofibras libres de ZnO. Estos resultados concuerdan con otros autores, los cuales determinaron una reducción del diámetro de las nanofibras tras la incorporación de partículas de ZnO (Magalhães Dias et al., 2019; Münchow et al., 2015).

Las nanofibras elaboradas son ligeramente citotóxicas sobre fibroblastos de ligamento periodontal humano, sin embargo, se consideraron citocompatibles con una viabilidad mayor al 50% (Münchow et al., 2015). Sorpresivamente, la viabilidad celular mejoró con el tiempo de exposición a los eluatos de las nanofibras. Este resultado podría explicarse por la presencia de AMB, P61 y ZnO, que podrían estimular el crecimiento celular. Se ha informado que la viabilidad y la osteodiferenciación de las células madre del ligamento periodontal están soportadas por la presencia de partículas de ZnO, sin afectar negativamente sus características de biocompatibilidad (Nasajpour et al., 2018). No obstante, estos resultados deben ser verificados por otros métodos como el ensayo de apoptosis por Anexina V, para determinar si AMB y/o P61 pueden estar estimulando la viabilidad celular.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, mediante la prueba difusión en disco se demostró que las nanofibras cargadas con AMB (Nf 1), AMB-ZnO (Nf 2), AMB-P61 (Nf 5) y AMB-P61-ZnO (Nf 6) son capaces de inhibir el crecimiento y la viabilidad del conjunto de microorganismos evaluados, indicando una potencial sinergia entre las sustancias. Incluso, las nanofibras en combinación con ZnO, incrementaron su efecto inhibitorio. En cambio, las nanofibras de P61 (Nf 3) y P61-ZnO (Nf 4), no tuvieron resultados positivos en la inhibición, a pesar que el P61 tiene actividad antimicrobiana reportada (Vargas Casanova et al., 2017). Estos resultados pueden ser atribuibles a la concentración disponible del péptido dentro de las nanofibras o a la poca difusión del péptido sobre el agar. Sin embargo, mediante el ensayo Microdilución en caldo, las nanofibras demostraron tener mayor actividad antimicrobiana, incluso las nanofibras con P61 y P61-ZnO disminuyeron la viabilidad microbiana en un 25% a las 48 horas de exposición, efecto que puede ser atribuible a la mayor difusión de los compuestos en el medio de cultivo utilizado. De igual forma la nanofibra con AMB-ZnO (Nf 2) mostró actividad, mejorando los resultados obtenidos por la nanofibra solo con AMB, lo que demuestra que en este caso el ZnO, mejoró la actividad de la

AMB, como un efecto sinérgico, incluso permitiendo una mayor difusión del antifúngico. Esta última hipótesis debe ser validada por pruebas de liberación, sin embargo, resultados publicados por Magalhães y colaboradores, demostraron que las nanofibras cargadas de Oxitetraciclina (OTC) y ZnO aumentan su capacidad de liberación con respecto a las nanofibras cargadas de solo OTC (Magalhães Dias et al., 2019). Por otro lado, la nanofibra con AMB-P61 (Nf 5) no disminuyeron la viabilidad como era lo esperado, teniendo en cuenta que las nanofibras con ambos compuestos por separado disminuyeron la viabilidad de los microorganismos. No obstante, las nanofibras con AMB-P61-ZnO (Nf 6) si disminuyó la viabilidad, probablemente por la acción sinérgica con el ZnO.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de la nanofibra cargada con ZnO (Nf 7) no fue demostrada por la prueba de difusión en disco, por el contrario, esta nanofibra mostró actividad antimicrobiana por el método de Microdilución, reduciendo en un 15% la viabilidad de los microorganismos mixtos. Resultados similares demostraron actividad antibacteriana de nanofibras cargadas con partículas de ZnO contra *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*, mediante la prueba Microdilución en caldo (Magalhães Dias et al., 2019) y *P. gingivalis* y *F. nucleatum* mediante la prueba difusión en disco (Münchow et al., 2015).

A partir de estos resultados se seleccionaron las nanofibras 1, 2, 5 y 6 para evaluar la actividad anti-biopelícula, usando la técnica CLSM, con la cual se cuantifica la viabilidad microbiana en función de la integridad de la membrana celular.

La nanofibra cargada con AMB-P61-ZnO (Nf 6) demostró tener mayor actividad anti-biopelícula comparada con las otras nanofibras, y aumentando su actividad con el tiempo de exposición disminuyendo un 40% la viabilidad de la biopelícula las 72 horas. No obstante, la nanofibra cargada con AMB-ZnO (Nf 2) sigue presentando actividad antimicrobiana, incluso mucho mejor que la que presenta la nanofibra cargada con AMB (Nf 1), esto puede deberse a la presencia de ZnO, como se mencionó anteriormente. Por otro lado, la nanofibra cargada con AMB-ZnO (Nf 5) tiene mejores resultados con un mayor tiempo de exposición (72 horas).

Existe evidencia limitada sobre la actividad anti-biopelícula contra biopelículas polimicrobianas, que incluyen levaduras y bacterias como patógenas periodontales. La mayoría de las investigaciones que se han reportado sobre el uso de nanofibras para la terapia periodontal evaluaron la actividad antimicrobiana de nanofibras cargadas de antibióticos de amplio espectro, como Metronidazol, Doxiciclina, Tetraciclina y Ciprofloxacina, contra bacterias planctónicas no

relacionadas usualmente con la periodontitis, como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, y *E. coli*. Adicionalmente, determinan que dichas nanofibras pueden ser usadas para tratamientos periodontales, sin evaluar la actividad anti-biopelícula (Deepak et al., 2018; Mirzaeei et al., 2021; Ranjbar-Mohammadi et al., 2016). Ahora bien, teniendo en cuenta los antecedentes de la presencia de levaduras participando en las biopelículas relacionadas con periodontitis, la propuesta del trabajo cobra importancia, debido a que se plantea el uso de un antifúngico y un péptido antimicrobiano, capaces de inhibir biopelículas polimicrobianas, que incluyan bacterias y levaduras.

El estudio actual mostró actividad antimicrobiana y anti-biopelícula de nanofibras de PCL/PLGA cargadas de AMB, P61 y ZnO contra microorganismos relacionados a periodontitis y AOS, con baja citotoxicidad. Según el mapeo tecnológico y la prospección tecnológica realizada, estas nanofibras pueden ser una estrategia potencial para el tratamiento local de la periodontitis, con el objetivo de ser aplicadas en personas con apnea obstructiva del sueño y por ende ayudando a disminuir los casos de periodontitis en personas que sufren este trastorno respiratorio.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- La asociación entre periodontitis y AOS se evidenció al compartir factores de riesgo como comorbilidades, siendo los más afectados los hombres. Hubo una mayor prevalencia de periodontitis estadio III y AOS severa.
- La microbiota oral de los pacientes con periodontitis y AOS, se alteró en términos de diversidad y aumento de microorganismos como bacterias de los complejos naranja y rojo, y *Candida* spp., siendo *Candida albicans* la especie más prevalente. Se destaca que esta levadura se correlacionó positivamente con la periodontitis. Además, estos microorganismos se correlacionaron positivamente con el porcentaje de biopelícula.
- Los niveles de IL-1 β e IL-6 en saliva, e IL-6, IL-17A e IL -33 en GCF se aumentaron en individuos con periodontitis y AOS. Aunado a esto, la microbiota disbiótica podría causar un aumento de las citocinas proinflamatorias, donde se destacó que la presencia de *Candida* spp. aumenta los niveles de IL-17A y IL-33 en FCG de individuos con ambas condiciones.
- A partir del perfil microbiano de los individuos con Periodontitis y AOS, se seleccionaron, aislaron y cultivaron nueve bacterias y *C. albicans* para establecer un modelo de biopelícula polimicrobiano *in vitro*, con el cual se evaluó el efecto antimicrobiano de las nanofibras de AMB/LfcinB (21-25)_{pal} (P61)/ZnO.
- Las nanofibras evaluadas fueron biocompatibles demostrando una viabilidad celular de fibroblastos del ligamento periodontal humano (HPdLF) de más del 50%. La nanofibra seis (Nf 6), la cual contenía AMB, LfcinB (21-25)_{pal} (P61) y ZnO, mostró mayor inhibición tiempo-dependiente de la biopelícula polimicrobiana *in vitro*, relacionada con la periodontitis asociada a la apnea obstructiva del sueño.

- La AMB tiene la capacidad de inhibir bacterias, el péptido de LfcinB (21-25)_{pal} (P61) y el ZnO aumentan la actividad anti-biopelícula. Sin embargo debido a la resistencia de poseen las biopelículas a agentes antimicrobianos, se logró una inhibición no mayor del 50%.
- Las nanofibras exhibieron un aspecto similar, de textura suave, buena estabilidad mecánica y térmica, de fácil manipulación, con una distribución de diámetro de fibra homogénea, y de naturaleza hidrofóbica, a excepción de la nanofibra seis (Nf 6), con mejor actividad anti-biopelícula, la cual fue hidrofílica.
- La nanofibra compuesta de AMB/LfcinB (21-25)_{pal} (P61)/ZnO – (Nf 6) con mejor actividad anti-biopelícula puede ser una alternativa terapéutica promisorio para el tratamiento de la periodontitis asociada a la AOS, por lo tanto, se propone esta nanofibra como una tecnología posiblemente patentable.



PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

- Mejorar la actividad antibiopelícula y disminuir la actividad citotóxica de las nanofibras cargadas con AMB/LfcinB_{pal} (P61) /ZnO, y determinar cuáles microorganismos se afectan en la biopelícula polimicrobiana *in vitro* al estar expuesta a las nanofibras.
- Determinar la liberación de AMB y LfcinB_{pal} (P61) a partir de las nanofibras mediante HPLC.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de las nanofibras cargadas con AMB/LfcinB_{pal} (P61) /ZnO.
- Adaptar las nanofibras a dispositivos intraorales para el tratamiento de la periodontitis en individuos con AOS.
- Patentar la realización y uso de las nanofibras para la terapia periodontal.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- AL-Janabi, A., & Abdulkareem, M. (2018). Elevation of the resistance of heat - cured acrylic denture base resin against biofilm - forming *Candida albicans* by incorporating Amphotericin B or Clotrimazole. *Journal of Oral Research and Review*, 10, 51–56. <https://doi.org/10.4103/jorr.jorr>
- Al-Jewair, T., Apessos, I., Stellrecht, E., Koch, R., & Almaghrabi, B. (2020). An Update on the Association Between Periodontitis and Obstructive Sleep Apnea. *Current Oral Health Reports*, 7(3), 189–201. <https://doi.org/10.1007/s40496-020-00271-5>
- Al-Jewair, T. S., Al-Jasser, R., & Almas, K. (2015). Periodontitis and obstructive sleep apnea's bidirectional relationship: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Breath*, 19(4), 1111–1120. <https://doi.org/10.1007/s11325-015-1160-8>
- Allaker, R. P. (2012). Nanoparticles and the Control of Oral Biofilms. In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-3127-5.00010-6>
- Arslan, S. Y., Leung, K. P., & Wu, C. D. (2009). The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(5), 411–416. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00537.x>
- Arumugam, M. (2015). A Comparative Evaluation of Subgingival Occurrence of *Candida* Species in Chronic Periodontitis and Peri-implantitis : A Clinical and Microbiological Study. *International Journal of Clinic Implant Dentis*, 1(December), 95–100.
- Asgari, Q., Alishahi, M., Davani, F., Caravan, D., Khorram, M., Enjavi, Y., Barzegar, S., Esfandiari, F., & Zomorodian, K. (2021). Fabrication of amphotericin B-loaded electrospun core-shell nanofibers as a novel dressing for superficial mycoses and cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Pharmaceutics*, 606(April), 120911. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120911>
- Bechinger, B., & Gorr, S. U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Beitelshees, M., Hill, A., Jones, C. H., & Pfeifer, B. A. (2018). Phenotypic variation during biofilm formation: Implications for anti-biofilm therapeutic design. *Materials*, 11(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ma11071086>
- Benjafield, A. V., Ayas, N. T., Eastwood, P. R., Heinzer, R., Ip, M. S. M., Morrell, M. J., Nunez, C. M., Patel, S. R., Penzel, T., Pépin, J.-L., Peppard, P. E., Sinha, S., Tufik, S., Valentine, K., & Malhotra, A. (2019). Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 7(8), 687–698. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30198-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30198-5)
- Bernard, C., Renaudeau, N., Mollichella, M. L., Quellard, N., Girardot, M., & Imbert, C. (2018). *Cutibacterium acnes* protects *Candida albicans* from the effect of micafungin in biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(6), 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.009>
- Bianchi, G., de'Angelis, N., Gavriilidis, P., Sobhani, I., de'Angelis, G. L., & Carra, M. C. (2022). Oral microbiota in obstructive sleep apnea patients: a systematic review. *Sleep and Breathing*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11325-022-02718-8>
- Bottino, M. C., Arthur, R. A., Waeiss, R. A., Kamocki, K., Gregson, K. S., & Gregory, R. L. (2014). Biodegradable nanofibrous drug delivery systems: effects of metronidazole and ciprofloxacin on periodontopathogens and commensal oral bacteria. *Clinical Oral Investigations*, 18(9), 2151–2158. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1201-x>
- Budai-Szúcs, M., Léber, A., Cui, L., Józó, M., Vályi, P., Burián, K., Kirschweng, B., Csányi, E., & Pukánszky, B. (2020). Electrospun

- PLA fibers containing metronidazole for periodontal disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 233–242. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S231748>
- Bui, F. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J., Asadi, H., & Ojcius, D. M. (2019). Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomedical Journal*, 42(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>
- Bunte, K., & Beikler, T. (2019). Th17 cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-mediated inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143394>
- Can, M., & Guven, B. (2016). Effect of continuous positive airway pressure (CPAP) therapy on IL-23 in patients with obstructive sleep apnea. *Immunologic Research*, 64, 1179–1184. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8869-8>
- Canabarro, A., Valle, C., Farias, M. R., Santos, F. B., Lazera, M., & Wanke, B. (2013). Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 48(4), 428–432. <https://doi.org/10.1111/jre.12022>
- Castañeda-casimiro, J., Ortega-roque, J. A., Marcela, A., Aquino-andrade, A., Serafín-lópez, J., Estrada-parra, S., & Estrada, I. (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 18, 16–29.
- Cavalcanti, Y. W., Morse, D. J., da Silva, W. J., Del-Bel-Cury, A. A., Wei, X., Wilson, M., Milward, P., Lewis, M., Bradshaw, D., & Williams, D. W. (2015). Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling*, 31(1), 27–38. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.996143>
- Cayrol, C., & Girard, J. P. (2018). Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunological Reviews*, 281(1), 154–168. <https://doi.org/10.1111/imr.12619>
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57–80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
- Chang, H., Chen, Y., & Du, J. (2020). Obstructive sleep apnea treatment in adults. *Journal of Medical Sciences*, 36, 7–12. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12130>
- Chaturvedi, T. P., Srivastava, R., Srivastava, A. K., Gupta, V., & Verma, P. K. (2013). Doxycycline poly e-caprolactone nanofibers in patients with chronic periodontitis - A clinical evaluation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(10), 2339–2342. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5858.3519>
- Chen, B., Liu, Y. nan, Ji, L., Liu, P. li, He, J., Gan, Y. ying, Ji, G. juan, Zhu, S. yang, & Zhang, W. hui. (2021). Elevated levels of interleukin-35 and interleukin-37 in adult patients with obstructive sleep apnea. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(6), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcla.23790>
- Chen, M. X., Zhong, Y. J., Dong, Q. Q., Wong, H. M., & Wen, Y. F. (2021). Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990–2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Journal of Clinical Periodontology*, 48(9), 1165–1188. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13506>
- Chen, X., Chen, Y., Feng, M., Huang, X., Li, C., Han, F., Zhang, Q., & Gao, X. (2022). Altered Salivary Microbiota in Patients with Obstructive Sleep Apnea Comorbid Hypertension. *Nature and Science of Sleep*, 14(April), 593–607.
- Chen, Y., Chen, X., Huang, X., Duan, Y., Gao, H., & Gao, X. (2021). Analysis of Salivary Microbiome and Its Association With Periodontitis in Patients With Obstructive Sleep Apnea. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.752475>

- Cheng, R., Wu, Z., Li, M., Shao, M., & Hu, T. (2020). Interleukin-1 β is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *International Journal of Oral Science*, *12*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0068-8>
- Chi, M., Qi, M., Lan, A., Wang, P., Weir, M. D., Melo, M. A., Sun, X., Dong, B., Li, C., Wu, J., Wang, L., & Xu, H. H. K. (2019). Novel bioactive and therapeutic dental polymeric materials to inhibit periodontal pathogens and biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020278>
- Chung, P. Y., & Khanum, R. (2017). Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *50*(4), 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
- Cierech, M., Kolenda, A., Grudniak, A. M., Wojnarowicz, J., Woźniak C, B., Goła, M., Swoboda-Kope, E., Łojkowski, W., & Zbieta Mierzwińska-Nastalska, E. (2016). Significance of polymethylmethacrylate (PMMA) modification by zinc oxide nanoparticles for fungal biofilm formation. *International Journal of Pharmaceutics*, *510*, 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.052>
- Colombo, A. P. V., & Tanner, A. C. R. (2019). The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective. *Journal of Dental Research*, *98*(4), 373–385. <https://doi.org/10.1177/0022034519830686>
- Conti, H. R., & Gaffen, S. L. (2015). IL-17–Mediated Immunity to the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, *195*(3), 780–788. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500909>
- Cordero da Luz, A. F., Lima Oliveira, P. A., Borges, D., Brígido, P. C., & Barbosa Silva, J. M. (2014). The Physiopathological Role of IL-33 : New Highlights in Bone Biology and a Proposed Role in Periodontal Disease. *Mediators of Inflammation*, *2014*, 1–8.
- Cuervo, A., Martínez, M. C., Sosa, G., Hernández, M., Latorre, C., Escobar, F., & Velosa, J. (2016). Condición periodontal de pacientes con apnea obstructiva del sueño. *Universitas Odontológica*, *33*(June), 1–34. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo35-74.cppa>
- Curtis, M. A., Diaz, P. I., & Van Dyke, T. E. (2020). The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology 2000*, *83*(1), 14–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12296>
- De la Calle, N., Santa, C., & Cardona, N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina*, *26*(1), 43–55. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052012000100005
- Deepak, A., Goyal, A. K., & Rath, G. (2018). Development and Characterization of Novel Medicated Nanofiber for the Treatment of Periodontitis. *AAPS PharmSciTech*, *19*(8), 3687–3697. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1177-y>
- Del Rei, C., De Luna, J., Dantas, S., Araujo, C., Prosiní, T., De Oliveira, J., & Piza, E. (2021). Use of chlorhexidine chip after scaling and root planning on periodontal disease: A systematic review and meta-analysis. *Saudi Dental Journal*, *33*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2020.11.002>
- Di Cristo, F., Valentino, A., De Luca, I., Peluso, G., Bonadies, I., Calarco, A., & Di Salle, A. (2022). PLA Nanofibers for Microenvironmental-Responsive Quercetin Release in Local Periodontal Treatment. *Molecules*, *27*(7). <https://doi.org/10.3390/molecules27072205>
- Diaz, P. I., Xie, Z., Sobue, T., Thompson, A., Biyikoglu, B., Ricker, A., Ikonomou, L., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2012). Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infection and Immunity*, *80*(2), 620–632. <https://doi.org/10.1128/IAI.05896-11>
- dos Santos, G. O., Milanesi, F. C., Greggianin, B. F., Fernandes, M. I., Oppermann, R. V., & Weidlich, P. (2017). Chlorhexidine with or without alcohol against biofilm formation: efficacy, adverse events and taste preference. *Brazilian Oral Research*, *31*, 1–9.

<https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0032>

- Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., Ikeuchi, T., Brenchley, L., Abe, T., Hurabielle, C., Martin, D., Morell, R. J., Freeman, A. F., Lazarevic, V., Trinchieri, G., Diaz, P. I., Holland, S. M., Belkaid, Y., Hajishengallis, G., & Moutsopoulos, N. M. (2018). A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Science Translational Medicine*, *10*(463), 1–12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0797>
- Elfil, M., Bahbah, E. I., Attia, M. M., Eldokmak, M., & Koo, B. B. (2021). Impact of Obstructive Sleep Apnea on Cognitive and Motor Functions in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, *36*(3), 570–580. <https://doi.org/10.1002/mds.28412>
- Elnagdy, S., Raptopoulos, M., Kormas, I., Pedercini, A., & Wolff, L. F. (2021). Local Oral Delivery Agents with Anti-Biofilm Properties for the Treatment of Periodontitis and Peri-Implantitis . A Narrative Review. *Molecules*, *26*(5661), 1–13.
- Emery, D. C., Shoemark, D. K., Batstone, T. E., Waterfall, C. M., Coghill, J. A., Cerajewska, T. L., Davies, M., West, N. X., & Allen, S. J. (2017). 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00195>
- Escobar, F., Latorre, C., Velosa, J., Ferro, M. B., Ruiz, A., Arregoces, F. E., Uriza, C. L., Porras, J. V., Camargo, M. B. F., & Morales, A. R. (2014). Relation between ultra-sensitive C-reactive protein, diabetes and periodontal disease in patients with and without myocardial infarction. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, *58*(4), 362–368. <https://doi.org/10.1590/0004-2730000002899>
- Feres, M., Figueiredo, L. C., Soares, G. M. S., & Faveri, M. (2015). Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontology 2000*, *67*(1), 131–186. <https://doi.org/10.1111/prd.12075>
- Ferini-Strambi, L., Hensley, M., & Salsone, M. (2021). Decoding Causal Links Between Sleep Apnea and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *80*(1), 29–40. <https://doi.org/10.3233/JAD-201066>
- Fernandesa, T., Bhavsara, C., Sawarkara, S., & D'souza, A. (2018). Current and novel approaches for control of dental biofilm. *International Journal of Pharmaceutics*, *536*, 199–210.
- Fernández-Rivero, M. E., del Pozo, J. L., Valentín, A., Fornes, V., Molina de Diego, A., Pemán, J., & Cantón, E. (2017). Actividad de la anfotericina B y la anidulafungina, solas y combinadas, frente a biopelículas de *Candida tropicalis* formadas sobre Teflon® y titanio. *Revista Iberoamericana de Micología*, *34*(3), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.01.002>
- Fischer, R. G., Lira Junior, R., Retamal-Valdes, B., de Figueiredo, L. C., Malheiros, Z., Stewart, B., & Feres, M. (2020). Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Brazilian Oral Research*, *34*, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2020.VOL34.0026>
- Fox, E. P., Cowley, E. S., Nobile, C. J., Hartooni, N., Newman, D. K., & Johnson, A. D. (2014). Anaerobic Bacteria Grow within *Candida albicans* Biofilms and Induce Biofilm Formation in Suspension Cultures. *Current Biology*, *24*(20), 2411–2416. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.057>
- Fujii, R., Saito, Y., Tokura, Y., Nakagawa, K.-I., Okuda, K., & Ishihara, K. (2009). Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, *24*(6), 502–505. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00534.x>
- Gabryelska, A., Kuna, P., Antczak, A., Białasiewicz, P., & Panek, M. (2019). IL-33 Mediated Inflammation in Chronic Respiratory Diseases — Understanding the Role of the Member of IL-1 Superfamily. *Frontiers in Immunology*, *10*(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00692>

- Gaffen, S. L., & Moutsopoulos, N. M. (2020). Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Science Immunology*, 5(43). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau4594>
- Gamsiz-Isik, H., Kiyani, E., Bingol, Z., Baser, U., Ademoglu, E., & Yalcin, F. (2017). Does Obstructive Sleep Apnea Increase the Risk for Periodontal Disease? A Case-Control Study. *Journal of Periodontology*, 88(5), 443–449. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160365>
- Gao, J., Chen, S., Tang, D., Jiang, L., Shi, J., & Wang, S. (2019). Mechanical Properties and Degradability of Electrospun PCL/PLGA Blended Scaffolds as Vascular Grafts. *Transactions of Tianjin University*, 25(2), 152–160. <https://doi.org/10.1007/s12209-018-0152-8>
- Garvey, J. F., Pengo, M. F., Drakatos, P., & Kent, B. D. (2015). Epidemiological aspects of obstructive sleep apnea. *Journal of Thoracic Disease*, 7(5), 920–929. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.04.52>
- Garzón, H., Suárez, L. J., Muñoz, S., Cardona, J., Fontalvo, M., & Alfonso-Rodríguez, C. A. (2022). Biomaterials Used for Periodontal Disease Treatment: Focusing on Immunomodulatory Properties. *International Journal of Biomaterials*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7693793>
- Genco, R. J., & Sanz, M. (2020). Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontology 2000*, 83, 7–13. <https://doi.org/10.1111/prd.12344>
- Gifford, J. L., Hunter, H. N., & Vogel, H. J. (2005). Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2588–2598. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5373-z>
- Graziani, F., Karapetsa, D., Alonso, B., & Herrera, D. (2017). Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontology 2000*, 75(1), 152–188. <https://doi.org/10.1111/prd.12201>
- Gunaratnam, K., Taylor, B., Curtis, B., & Cistulli, P. (2009). Obstructive sleep apnoea and periodontitis: a novel association? *Sleep and Breathing*, 13(3), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s11325-008-0244-0>
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Patel, M. R., & Song, X. (2008). Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(3), 196–205. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x>
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
- Hajishengallis, G., Kajikawa, T., Hajishengallis, E., Maekawa, T., Reis, E. S., Mastellos, D. C., Yancopoulou, D., Hasturk, H., & Lambris, J. D. (2019). Complement-dependent mechanisms and interventions in periodontal disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00406>
- Hajishengallis, G., & Korostoff, J. M. (2017). Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontology 2000*, 75(1), 116–151. <https://doi.org/10.1111/prd.12181>
- Hamill, R. J. (2013). Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, 73(9), 919–934. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0069-4>
- Hao, Y., Yang, N., Teng, D., Wang, X., Mao, R., Wang, J., & Wang, R. M. Á. J. (2018). A review of the design and modification of lactoferricins and their derivatives. *BioMetals*, 31(3), 331–341. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0086-6>
- Hidalgo-Martínez, P., & Lobelo, R. (2017). Epidemiología mundial, latinoamericana y colombiana y mortalidad del síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS). *Revista de La Facultad de Medicina*, 65(1Sup), 17–20.

<https://doi.org/10.15446/revfacmed.v65n1Sup.59565>

Ho, M. H., Claudia, J. C., Tai, W. C., Huang, K. Y., Lai, C. H., Chang, C. H., Chang, Y. C., Wu, Y. C., Kuo, M. Y. P., & Chang, P. C. (2021). The treatment response of barrier membrane with amoxicillin-loaded nanofibers in experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, *92*(6), 886–895. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0256>

Huang, Y., Guilleminault, C., Hwang, F., Cheng, C., Lin, C., Li, H., & Lee, L. (2016). Inflammatory cytokines in pediatric obstructive sleep apnea. *Medicine*, *95*(41), 1–8.

Jaedicke, K. M., Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2016). Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, *70*(1), 164–183. <https://doi.org/10.1111/prd.12117>

Janus, M. M., Crielaard, W., Volgenant, C. M. C., der Veen, M. H. va., Brandt, B. W., & Krom, B. P. (2017). Candida albicans alters the bacterial microbiome of early in vitro oral biofilms. *Journal of Oral Microbiology*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1270613>

Jia, P., Zou, J., Yin, S., Chen, F., Yi, H., & Zhang, Q. (2020). Analysis of the Salivary Microbiome in Obstructive Sleep Apnea Syndrome Patients. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, *2020*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/6682020>

Justeau, G., Gervès-Pinquier, C., Le Vaillant, M., Trzepizur, W., Meslier, N., Goupil, F., Pigeanne, T., Launois, S., Leclair-Visonneau, L., Masson, P., Bizieux-Thaminy, A., Humeau, M. P., Gosselin, C., Blanchard, M., Urban, T., Gagnadoux, F., Person, C., Priou, P., Molinier, O., ... Rouault, B. (2020). Association Between Nocturnal Hypoxemia and Cancer Incidence in Patients Investigated for OSA: Data From a Large Multicenter French Cohort. *Chest*, *158*(6), 2610–2620. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.06.055>

Keller, J. J., Wu, C.-S., Chen, Y.-H., & Lin, H.-C. (2013). Association between obstructive sleep apnoea and chronic periodontitis: a population-based study. *Journal of Clinical Periodontology*, *40*(2), 111–117. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12036>

Khodadadi, N., Khodadadi, M., & Zamani, M. (2022). Is periodontitis associated with obstructive sleep apnea? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, *14*(4), 359–365. <https://doi.org/10.4317/jced.59478>

Kim, J. Y., & Kim, H. N. (2020). Changes in inflammatory cytokines in saliva after non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijerph18010194>

Kimoff, R. J., Hamid, Q., Divangahi, M., Hussain, S., Bao, W., Naor, N., Payne, R. J., Ariyaratnam, A., Mulrain, K., & Petrof, B. J. (2011). Increased upper airway cytokines and oxidative stress in severe obstructive sleep apnoea. *European Respiratory Journal*, *38*(1), 89–97. <https://doi.org/10.1183/09031936.00048610>

Ko, C., Hu, A., Huang, D. C. L., Su, H., Yan, F., Zhang, X., Zhang, H., & Zeng, Y. (2019). Analysis of oral microbiota in patients with obstructive sleep apnea-associated hypertension. *Hypertension Research*, *42*, 1692–1700.

Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 740–755). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>

Kuhn, D. M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P., & Ghannoum, M. (2002). Antifungal Susceptibility of Candida Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(6), 1773–1780. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1773>

- Kurgan, S., & Kantarci, A. (2018). Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontology 2000*, 76(1). <https://doi.org/10.1111/prd.12146>
- Kuriyama, T., Dw, W., & Mao, L. (2003). In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiology Immunology*, 5, 405–407.
- Kwon, T., Lamster, I. B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*, 71(6), 462–476. <https://doi.org/10.1111/idj.12630>
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 745–759. <https://doi.org/10.17235/reed.20188.4947/2017>
- Lapérine, O., Cloitre, A., Caillon, J., Huck, O., Bugueno, I. M., Pilet, P., Sourice, S., Le Tilly, E., Palmer, G., Davideau, J. L., Geoffroy, V., Guicheux, J., Beck-Cormier, S., & Lesclous, P. (2016). Interleukin-33 and RANK-L interplay in the alveolar bone loss associated to periodontitis. *PLoS ONE*, 11(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168080>
- Larsen, T., & Fiehn, N. E. (2017). Dental biofilm infections – an update. *APMIS*, 125, 376–384. <https://doi.org/10.1111/apm.12688>
- Lasserre, J., Brex, M., & Toma, S. (2018). Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. *Materials*, 11(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ma11101802>
- Latorre, C., Escobar, F., Velosa, J., Rubiano, D., Hidalgo-Martinez, P., & Otero, L. (2018). Association between obstructive sleep apnea and comorbidities with periodontal disease in adults. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 22(3), 215–220. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_38_18
- Leheste, J. R., Ruvolo, K. E., Chrostowski, J. E., Rivera, K., Husko, C., Miceli, A., Selig, M. K., Brüggemann, H., & Torres, G. (2017). *P. acnes*-driven disease pathology: Current knowledge and future directions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00081>
- Lembo, D., Caroccia, F., Lopes, C., Moscagiuri, F., Sinjari, B., & D'Attilio, M. (2021). Obstructive sleep apnea and periodontal disease: A systematic review. *Medicina (Lithuania)*, 57(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/medicina57060640>
- Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
- Loke, W., Girvan, T., Ingmundson, P., Verrett, R., Schoolfield, J., & Mealey, B. L. (2015). Investigating the Association Between Obstructive Sleep Apnea and Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 86(2), 232–243. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140229>
- Lu, M., Xuan, S., & Wang, Z. (2019). Oral microbiota: A new view of body health. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.12.001>
- Magalhães Dias, A., Gontijo da Silva, F., de Figueiredo Monteiro, A. P., Pinzón-García, A. D., Sinisterra, R. D., & Cortés, M. E. (2019). Polycaprolactone nanofibers loaded oxytetracycline hydrochloride and zinc oxide for treatment of periodontal disease. *Materials Science and Engineering C*, 103(July 2018), 109798. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109798>
- Mahamuni-Badiger, P. P., Patil, P. M., Badiger, M. V., Patel, P. R., Thorat-Gadgil, B. S., Pandit, A., & Bohara, R. A. (2020). Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 108(June 2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110319>
- Martin, C., Low, W., Gupta, A., Amin, M., Radecka, I., Britland, S., & Kenward, K. (2015). Strategies for Antimicrobial Drug Delivery to Biofilm. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 43–66. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905123529>

- Martin, R., Wächtler, B., Schaller, M., Wilson, D., & Hube, B. (2011). Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(5), 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.009>
- Mayorga-Fayad, I., Lafaurie, G. I., Contreras, A., Castillo, D. M., Barón, A., & Aya, M. del R. (2007). Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogotá, Colombia: an epidemiological approach. *Biomédica*, 27(1), 21–33.
- Mecenas, P., Miranda, G. H. N., Fagundes, N. C. F., Normando, D., & Ribeiro, K. C. F. (2021). Effects of oral appliances on serum cytokines in adults with obstructive sleep apnea: a systematic review. *Sleep and Breathing*, Sept., 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11325-021-02485-y>
- Medara, N., Lenzo, J. C., Walsh, K. A., Reynolds, E. C., Darby, I. B., & O'Brien-Simpson, N. M. (2021). A review of T helper 17 cell-related cytokines in serum and saliva in periodontitis. *Cytokine*, 138(November 2020), 155340. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155340>
- Miller, D. P., Fitzsimonds, Z. R., & Lamont, R. J. (2019). Metabolic Signaling and Spatial Interactions in the Oral Polymicrobial Community. *Journal of Dental Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1177/0022034519866440>
- Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>
- Ministerio de Salud y Protección Social, & MINSALUD. (2014). IV Estudio Nacional De Salud Bucal - ENSAB IV. *Bogotá, Colombia*, 3, 381. <https://doi.org/10.1787/9789264207813-3-es>
- Minoguchi, K., Tazaki, T., Yokoe, T., Minoguchi, H., Watanabe, Y., Yamamoto, M., & Adachi, M. (2004). Elevated production of tumor necrosis factor- α by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*, 126(5), 1473–1479. <https://doi.org/10.1378/chest.126.5.1473>
- Mirzaeei, S., Mansurian, M., Asare-Addo, K., & Nokhodchi, A. (2021). Metronidazole-and amoxicillin-loaded plga and pcl nanofibers as potential drug delivery systems for the treatment of periodontitis: In vitro and in vivo evaluations. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080975>
- Münchow, E. A., Albuquerque, M. T. P., Zero, B., Kamocki, K., Piva, E., Gregory, R. L., & Bottino, M. C. (2015). Development and characterization of novel ZnO-loaded electrospun membranes for periodontal regeneration. *Dental Materials*, 31(9), 1038–1051. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.06.004>
- Nasajpour, A., Ansari, S., Rinaldi, C., Rad, A. S., Aghaloo, T., Shin, S. R., Mishra, Y. K., Adelung, R., Swieszkowski, W., Annabi, N., Khademhosseini, A., Moshaverinia, A., & Tamayol, A. (2018). A Multifunctional Polymeric Periodontal Membrane with Osteogenic and Antibacterial Characteristics. *Advanced Functional Materials*, 28(3), 1–8. <https://doi.org/10.1002/adfm.201703437>
- Nędzi-Góra, M., Górska, R., & Górski, B. (2020). Is the progression rate of periodontitis related to subgingival biofilm composition or gingival crevicular fluid IL-1 β and MMP-8 concentrations? *Central European Journal of Immunology*, 45(4), 425–432. <https://doi.org/10.5114/CEJI.2020.101256>
- Nizam, N., Basoglu, O. K., Tasbakan, M. S., & Holtho, A. (2015). Do salivary and serum collagenases have a role in an association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal disease? A preliminary case – control study. *Archives of Oral Biology*, 60, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.09.006>
- Nizam, N., Basoglu, O., Tasbakan, M., Nalbantsoy, A., & Buduneli, N. (2014). Salivary Cytokines and the Association Between

Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 85(7), e251–e258. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130579>

Nizam, N., Tasbakan, M. S., Basoglu, O. K., Lappin, D. F., & Buduneli, N. (2016). Is there an association between obstructive sleep apnea syndrome and periodontal inflammation? *Clinical Oral Investigations*, 20(4), 659–668. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1544-y>

Nogueira Haas, A., Furlaneto, F., Gaio, E. J., Carvalho Gomes, S., Bazan Palioto, D., Moraes Castilho, R., Sanz, M., & Reis Messora, M. (2021). New tendencies in non-surgical periodontal therapy. *Brazilian Oral Research*, 35, 1–18.

O'Donnell, L. E., Millhouse, E., Sherry, L., Kean, R., Malcolm, J., Nile, C. J., & Ramage, G. (2015). Polymicrobial Candida biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Research*, 15(7), 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov077>

Otero, L., Hidalgo, P., González, R., & Morillo, C. A. (2016). Association of Cardiovascular Disease and Sleep Apnea at Different Altitudes. *High Altitude Medicine & Biology*, 17(4), 336–341. <https://doi.org/10.1089/ham.2016.0027>

Pai B, S., & Pradeep, A. R. (2019). Correlations between Interleukin-33 and -1 α Levels in Gingival Crevicular Fluid and Plasma in Patients with Chronic or Aggressive Periodontitis and Disease-free Subjects. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 60(4), 279–289. <https://doi.org/10.2209/tdcpublication.2019-0002>

Palma, P. V., & Leite, I. C. G. (2014). Epidemiology and social inequalities of periodontal disease in Brazil. *Frontiers in Public Health*, 2(October), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00203>

Park, S. J., Cho, H. R., & Kwon, B. (2016). Roles of IL-33 in resistance and tolerance to systemic candida albicans infections. *Immune Network*, 16(3), 159–164. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.3.159>

Patil, V. A., & Desai, M. H. (2014). Biology of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL) and Osteoprotegerin (OPG) in Periodontal Health and Disease - A Review. *People's Journal of Scientific Research*, 7(1), 58–63.

Pawlik, J., Łukowicz, K., Cholewa-Kowalska, K., & Osyczka, A. M. (2019). New insights into the PLGA and PCL blending: Physico-mechanical properties and cell response. *Materials Research Express*, 6(8), 0–13. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab2823>

Pianeta, R., Iniesta, M., Castillo, D. M., Lafaurie, G. I., Sanz, M., & Herrera, D. (2021). Characterization of the subgingival cultivable microbiota in patients with different stages of periodontitis in Spain and Colombia. A cross-sectional study. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091940>

Pierce, C., Vila, T., Romo, J., Montelongo-Jauregui, D., Wall, G., Ramasubramanian, A., & Lopez-Ribot, J. (2017). The Candida albicans Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *Journal of Fungi*, 3(1), 14. <https://doi.org/10.3390/jof3010014>

Piñon-Segundo, E., Mendoza-Muñoz, N., & Quintanar-Guerrero, D. (2019). Nanoparticles as dental drug-delivery systems. In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry* (pp. 567–593). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815886-9.00023-1>

Polsek, D., Gildeh, N., Cash, D., Winsky-Sommerer, R., Williams, S. C. R., Turkheimer, F., Leschziner, G. D., Morrell, M. J., & Rosenzweig, I. (2018). Obstructive sleep apnoea and Alzheimer's disease: In search of shared pathomechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 86(October 2017), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.12.004>

Prabhakar, N. R., Peng, Y., & Nanduri, J. (2020). Hypoxia-inducible factors and obstructive sleep apnea Hypoxia-inducible factors and obstructive sleep apnea. *Journal of Clinical Investigation*, 130(10), 5042–5051.

Prakasam, S., & Srinivasan, M. (2014). Evaluation of salivary biomarker profiles following non-surgical management of chronic periodontitis. *Oral Diseases*, 20(2), 171–177. <https://doi.org/10.1111/odi.12085>

- Quindós, G., Gil-Alonso, S., Marcos-Arias, C., Sevillano, E., Mateo, E., Jauregizar, N., & Eraso, E. (2019). Management options for low-dose methotrexate-induced oral ulcers: A systematic review. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, *24*(2), e172–e180. <https://doi.org/10.4317/medoral.22978>
- Radunovic, M., Barac, M., Pfcicer, J. K., Pavlica, D., Jovanovic, A., Pucar, A., & Petrovic, S. (2022). Antifungal Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Tongue and Subgingival Biofilm of Periodontitis Patients. *Antibiotics*, *11*(802), 1–13.
- Ralls, F. M., & Grigg-Damberger, M. (2012). Roles of gender, age, race/ethnicity, and residential socioeconomic in obstructive sleep apnea syndromes. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, *18*(6), 568–573. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328358be05>
- Ranjbar-Mohammadi, M., Zamani, M., Prabhakaran, M. P., Bahrami, S. H., & Ramakrishna, S. (2016). Electrospinning of PLGA/gum tragacanth nanofibers containing tetracycline hydrochloride for periodontal regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *58*, 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.066>
- Reale, M., Velluto, L., Di Nicola, M., D'angelo, C., Costantini, E., Marchioni, M., Cerroni, G., & Guarnieri, B. (2020). Cholinergic markers and cytokines in OSA patients. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms21093264>
- Román, J. T., Fuenmayor, C. A., Dominguez, C. M. Z., Clavijo-Grimaldo, Di., Acosta, M., García-Castañeda, J. E., Fierro-Medina, R., & Rivera-Monroy, Z. J. (2019). Pullulan nanofibers containing the antimicrobial palindromic peptide LfcinB (21-25)Pal obtained: Via electrospinning. *RSC Advances*, *9*(35), 20432–20438. <https://doi.org/10.1039/c9ra03643a>
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, *9*(1), 522–554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
- Ruangcharoen, S., Suwannarong, W., Khunkitti, W., & Taweekhaisupapong, S. (2017). Killing activity of LFchimera on periodontopathic bacteria and multispecies oral biofilm formation in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(9), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2334-2>
- Ruiz, A., Rendón, M., Hidalgo, P., Cañón, M., Otero, L., Panqueva, O., Uriza, L. F., & Ospina, J. C. (2016). Prevalence of sleep complaints in Colombia at different altitudes. *Sleep Science*, *9*(2), 100–105. <https://doi.org/10.1016/J.SLSCI.2016.05.008>
- Rundo, J. V., & Downey, R. (2019). Polysomnography. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 160, Issue 1877, pp. 381–392). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00025-4>
- Said, E. A., Al-Abri, M. A., Al-Saidi, I., Al-Balushi, M. S., Al-Busaidi, J. Z., Al-Reesi, I., Koh, C. Y., Hasson, S. S., Idris, M. A., Al-Jabri, A. A., & Habbal, O. (2017). Altered blood cytokines, CD4 T cells, NK and neutrophils in patients with obstructive sleep apnea. *Immunology Letters*, *190*(August), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.009>
- Sánchez, M. C., Llama-Palacios, A., Blanc, V., León, R., Herrera, D., & Sanz, M. (2011). Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research*, *46*(2), 252–260. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0765.2010.01341.X>
- Sanders, A. E., Essick, G. K., Beck, J. D., Cai, J., Beaver, S., Finlayson, T. L., Zee, P. C., Loredó, J. S., Ramos, A. R., Singer, R. H., Jimenez, M. C., Barnhart, J. M., & Redline, S. (2015). Periodontitis and Sleep Disordered Breathing in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Sleep*, *38*(8), 1195–1203. <https://doi.org/10.5665/sleep.4890>
- Sateia, M. J. (2014). International classification of sleep disorders-third edition highlights and modifications. *CHEST*, *146*(5), 1387–1394. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0970>
- Seo, W. H., Cho, E. R., Thomas, R. J., An, S. Y., Ryu, J. J., Kim, H., & Shin, C. (2013). The association between periodontitis and

- obstructive sleep apnea: A preliminary study. *Journal of Periodontal Research*, 48(4), 500–506. <https://doi.org/10.1111/jre.12032>
- Severino, V. O., Napimoga, M. H., & De Lima Pereira, S. A. (2011). Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Archives of Oral Biology*, 56(8), 823–828. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.006>
- Sevinç, B. A., & Hanley, L. (2010). Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 94(1), 22–31. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31620>
- Singhal, P. (2020). Preparation and characterization of poly (E-CAPROLACTONE) nano fibers by electrospinning technique for tissue engineering applications. *Materials Today: Proceedings*, 37(Part 2), 2997–3001. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.716>
- Sirisereephap, K., Maekawa, T., Tamura, H., Hiyoshi, T., Domon, H., Isono, T., Terao, Y., Maeda, T., & Tabeta, K. (2022). Osteoimmunology in Periodontitis: Local Proteins and Compounds to Alleviate Periodontitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms23105540>
- Slots, J. (2017). Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontology 2000*, 75(1), 7–23. <https://doi.org/10.1111/prd.12221>
- Socransky, S., & Haffajee, A. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, 28, 12–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21128362>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>
- Socransky, Sigmund S, & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38(1), 135–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>
- Soria, S., Angulo -Bejarano, P. I., & Sharma, A. (2019). Biofilms: Development and molecular interaction of microbiome in the human oral cavity. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms Current Research and Future Trends in Microbial Biofilms*, 61–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64279-0.00005-0>
- Souza, R. O., Lima, T. H. De, Lambert, R., Gonzaga, M., Araújo, D. F., Aparecida, S., Moura, D. L., Rodrigues, G., & Teixeira, J. (2018). Amphotericin B-Loaded Poly (lactic-co-glycolic acid) Nano fi bers : An Alternative Therapy Scheme for Local Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.06.017>
- Sozer, V., Kutnu, M., Atahan, E., Caliskaner, B., Hysi, E., Cabuk, C., Musellim, B., Simsek, G., & Uzun, H. (2018). Changes in inflammatory mediators as a result of intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *The Clinical Respiratory Journal*, 12(4), 1615–1622. <https://doi.org/10.1111/crj.12718>
- Stazić, P., Roguljić, M., Đogaš, Z., Lušić Kalcina, L., Pavlinac Dodig, I., Valić, M., Božić, D., & Pecotić, R. (2022). Periodontitis severity in obstructive sleep apnea patients. *Clinical Oral Investigations*, 26(1), 407–415. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04012-5>
- Stefano, M. Di, Polizzi, A., Santonocito, S., Romano, A., Lombardi, T., & Isola, G. (2022). Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis : A Critical Review on Prevention and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5142), 1–14.
- Stojanov, S., & Berlec, A. (2020). Electrospun Nanofibers as Carriers of Microorganisms , Stem Cells , Proteins , and Nucleic Acids in Therapeutic and Other Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00130>
- Sundaram, G., Ramakrishnan, T., Parthasarathy, H., Raja, M., & Raj, S. (2018). Higher interleukin-33 levels in aggressive periodontitis

- cases. *J Indian Soc Periodontol*, May, 113–118. <https://doi.org/10.4103/jisp.jisp>
- Sztukowska, M. N., Dutton, L. C., Delaney, C., Ramsdale, M., Ramage, G., Jenkinson, H. F., Nobbs, A. H., & Lamont, J. (2018). Community Development between *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* Mediated by InlJ and Als3. *MBio*, 9(2), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00202-18>
- Szulc, M., Zakrzewska, A., & Zborowski, J. (2018). Local drug delivery in periodontitis treatment : A review of contemporary literature. *Dental and Medical Problems*, 55(3), 333–342. <https://doi.org/10.17219/dmp/94890>
- Tamai, R., Sugamata, M., & Kiyoura, Y. (2011). *Candida albicans* enhances invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis*, 51(4), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.06.009>
- Tellez Corral, M. A., Herrera Daza, E., Cuervo Jimenez, H. K., Arango Jimenez, N., Morales Vera, D. Z., Velosa Porras, J., Latorre Uriza, C., Escobar Arregoces, F. M., Hidalgo Martínez, P., Cortes, M. E., Roa Molina, N. S., Otero Mendoza, L. M., & Parra Giraldo, C. M. (2022). Patients with obstructive sleep apnea can favor the predisposing factors of periodontitis by the presence *P. melaninogenica* and *C. albicans*, increasing the severity of the periodontal disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Sept., 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.934298>
- Tingting, X., Danming, Y., & Xin, C. (2018). Non-surgical treatment of obstructive sleep apnea syndrome. *European Archives of Otorhino-Laryngology*, 275(2), 335–346. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4818-y>
- Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K., & de la Fuente-Nunez, C. (2019). Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, 431, 3547–3567.
- Tripathi, A., Melnik, A. V., Xue, J., Poulsen, O., Meehan, M. J., Humphrey, G., Jiang, L., Ackermann, G., Mcdonald, D., Zhou, D., Knight, R., Dorrestein, P. C., & Haddad, G. G. (2018). Intermittent Hypoxia and Hypercapnia , a Hallmark of Obstructive Sleep Apnea, Alters the Gut Microbiome and Metabolome. *MSystems* 3, 3(3), 1–9.
- Uskokovi, V., & Pej, A. (2022). Polymeric nanotechnologies for the treatment of periodontitis : A chronological review. *International Journal of Pharmaceutics*, 625, 122065. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122065>
- Valentín, A., Cantón, E., Pemán, J., & Quindós, G. (2007). In vitro activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(4), 272–277. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70055-4](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70055-4)
- Vargas-Casanova, Y., Villamil Poveda, J. C., Rivera-Monroy, Z. J., Ceballos Garzón, A., Fierro-Medina, R., Le Pape, P., García-Castañeda, J. E., & Parra, C. M. (2020). Palindromic Peptide LfcinB (21-25)Pal Exhibited Antifungal Activity against Multidrug-Resistant *Candida*. *Chemistry Select*, 5, 7236–7242. <https://doi.org/doi.org/10.1002/slct.202001329>
- Vargas Casanova, Y. (2018). *Evaluación De La Actividad Antibacteriana De Péptidos Diméricos Y Tetraméricos Derivados De Lactoferricina Bovina Contra Bacterias Gram Positivas Y Gram Negativas*.
- Vargas Casanova, Y., Rodríguez Guerra, J. A., Umaña Pérez, Y. A., Leal Castro, A. L., Almanzar Reina, G., García Castañeda, J. E., & Rivera Monroy, Z. J. (2017). Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*, 22(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22101641>
- Vargas Casanova, Y., Rodríguez Mayor, A. V., Cardenas, K. J., Leal Castro, A. L., Muñoz Molina, L. C., Fierro Medina, R., Rivera Monroy, Z. J., & García Castañeda, J. E. (2019). Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains. *RSC Advances*, 9(13), 7239–7245. <https://doi.org/10.1039/c9ra00708c>

- Verhelst, A. R. E., Kosho, M. X. F., Aarab, G., & Loos, B. G. (2022). Screening for the Risk of OSA in Periodontitis Patients . A Pilot Study. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 20, 243–252. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.b3125665>
- Verma, P., Chaturvedi, T., Gupta, V., Srivastava, R., & Srivastava, A. (2012). Evaluation of metronidazole nanofibers in patients with chronic periodontitis: A clinical study. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(4), 213. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.107007>
- Vieira Colombo, A. P., Magalhães, C. B., Hartenbach, F. A. R. R., Martins do Souto, R., & Maciel da Silva-Boghossian, C. (2016). Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbial Pathogenesis*, 94, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.009>
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Kobayashi, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., & Yoshie, H. (2009). Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3308–3316. <https://doi.org/10.1128/AAC.01688-08>
- Wali, S. O., Al-Mughales, J., Alhejaili, F., Manzar, M. D., Alsallum, F., Almojaddidi, H., & Gozal, D. (2021). The utility of proinflammatory markers in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep and Breathing*, 25(2), 545–553. <https://doi.org/10.1007/s11325-020-02149-3>
- Wang, H. Y., Cheng, J. W., Yu, H. Y., Lin, L., Chih, Y. H., & Pan, Y. P. (2015). Efficacy of a novel antimicrobial peptide against periodontal pathogens in both planktonic and polymicrobial biofilm states. *Acta Biomaterialia*, 25, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.031>
- Wang, Y., Liu, Y., Zhang, X., Liu, N., Yu, X., Gao, M., Wang, W., & Wu, T. (2021). Engineering Electrospun Nanofibers for the Treatment of Oral Diseases. *Frontiers in Chemistry*, 9(December), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.797523>
- Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2017). Antibiofilm peptides against oral biofilms. *Journal of Oral Microbiology*, 9, 1–12.
- West, S. D., & Turnbull, C. (2018). Obstructive sleep apnoea. *Eye*, 32, 889–903. <https://doi.org/10.1038/s41433-017-0006-y>
- Williams, D. W., Jordan, R. P. C., Wei, X.-Q., Alves, C. T., Wise, M. P., Wilson, M. J., & Lewis, M. A. O. (2013). Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of Oral Microbiology*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.22434>
- Wu, J., Zhang, C., Xu, S., Xiang, C., Wang, R., Yang, D., Lu, B., Shi, L., Tong, R., Teng, Y., Dong, W., & Zhang, J. (2020). Fecal Microbiome Alteration May Be a Potential Marker for Gastric Cancer. *Disease Markers*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3461315>
- Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2000a). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(9), 648–657. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2000.027009648.x>
- Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2000b). Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(10), 722–732. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2000.027010722.x>
- Yamauchi, M., Tamaki, S., & Tomoda, K. (2006). Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*, 10, 189–193. <https://doi.org/10.1007/s11325-006-0074-x>
- Yang, Y., Xia, L., Haapasalo, M., Wei, W., Zhang, D., Ma, J., & Shen, Y. (2019). A novel hydroxyapatite-binding antimicrobial peptide against oral biofilms. *Clinical Oral Investigations*, 23(6), 2705–2712. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2701-x>
- Yi, M., Zhao, W., Tan, Y., Fei, Q., Liu, K., & Chen, Z. (2022). The causal relationships between obstructive sleep apnea and elevated CRP and TNF- α protein levels. *Annals of Medicine*, 54(1), 1578–1589. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2081873>

- Young, T., Alshanta, O., Kean, R., Bradshaw, D., Pratten, J., Williams, C., Woodall, C., Ramage, G., & Brown, J. (2021). *Candida albicans* as an essential “keystone” component within polymicrobial oral biofilm models? *Microorganisms*, 9(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010059>
- Zamani, M., Morshed, M., Varshosaz, J., & Jannesari, M. (2010). Controlled release of metronidazole benzoate from poly ϵ -caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.02.002>
- Zarzosa-Moreno, D., Avalos-Gómez, C., Ramírez-Texcalco, L. S., Torres-López, E., Ramírez-Mondragón, R., Hernández-Ramírez, J. O., Serrano-Luna, J., & de la Garza, M. (2020). Lactoferrin and its derived peptides: An alternative for combating virulence mechanisms developed by pathogens. *Molecules*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/molecules25245763>
- Zupančič, Š., Casula, L., Rijavec, T., Lapanje, A., Luštrik, M., Fadda, A. M., Kocbek, P., & Kristl, J. (2019). Sustained release of antimicrobials from double-layer nanofiber mats for local treatment of periodontal disease, evaluated using a new micro flow-through apparatus. *Journal of Controlled Release*, 316(September), 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.008>
- Zupančič, Š., Preem, L., Kristl, J., Putrinš, M., Tenson, T., Kocbek, P., & Kogermann, K. (2018). Impact of PCL nanofiber mat structural properties on hydrophilic drug release and antibacterial activity on periodontal pathogens. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122(February), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.024>



ANEXOS

ANEXOS

Artículo 2

Material suplementario

Cryptic oral microbiota: What is its role as OSA-related periodontal pathogens?

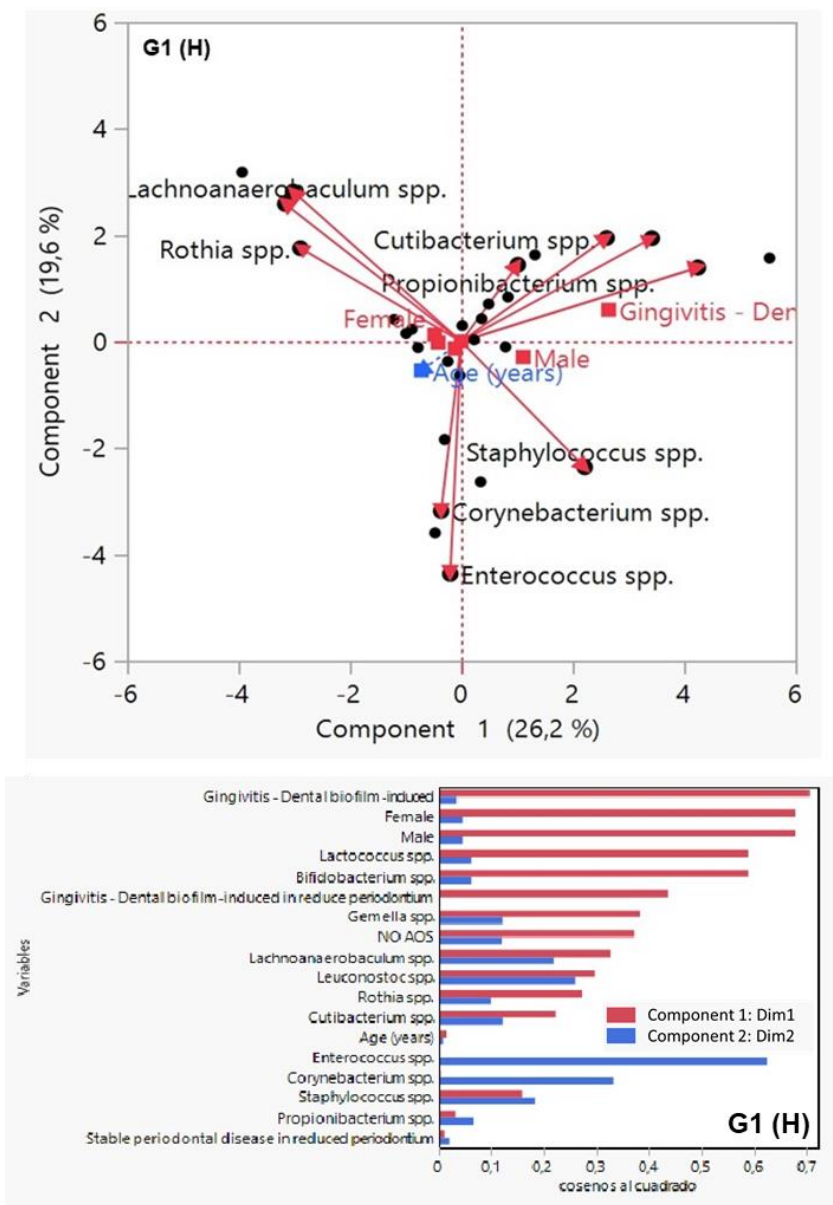


Figure S1. Principal Coordinates Analysis (PCoA) calculated by the relative abundance of microorganisms in G1 (H).

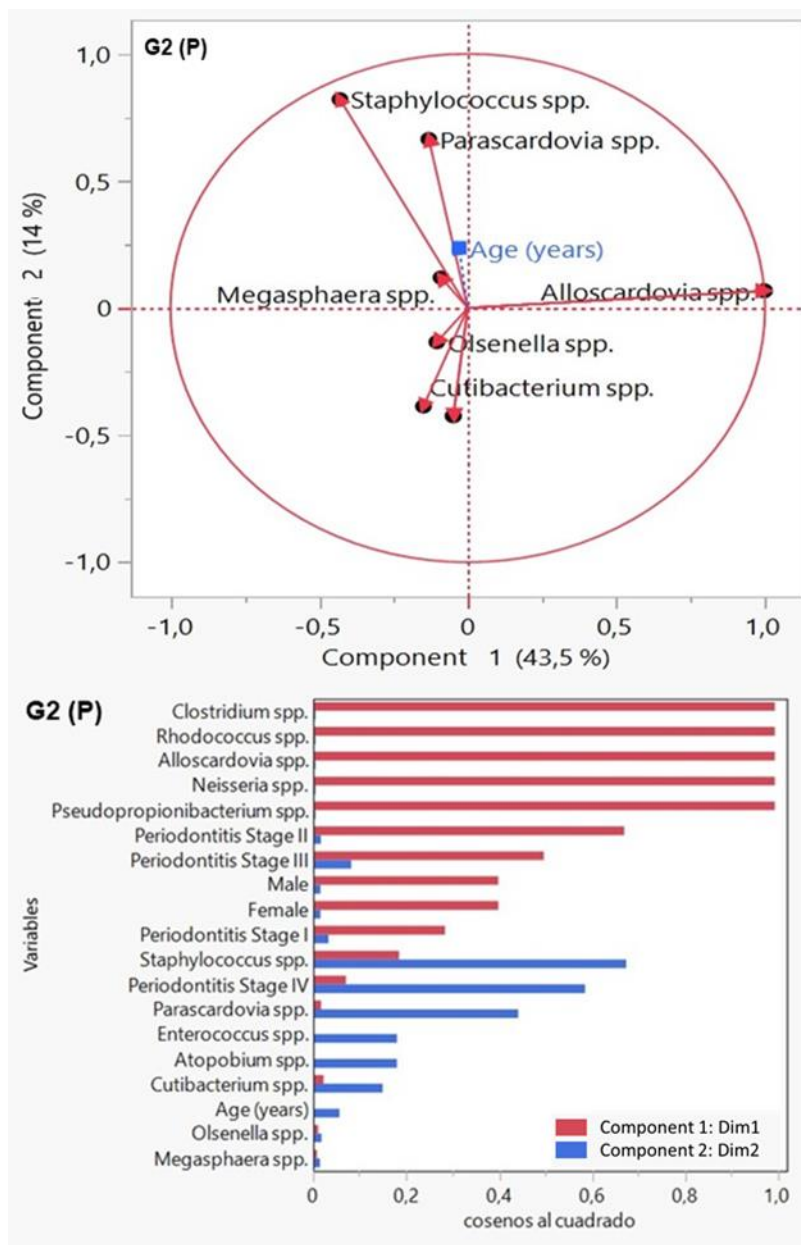


Figure S2. Principal Coordinates Analysis (PCoA) calculated by the relative abundance of microorganisms in G2 (P).

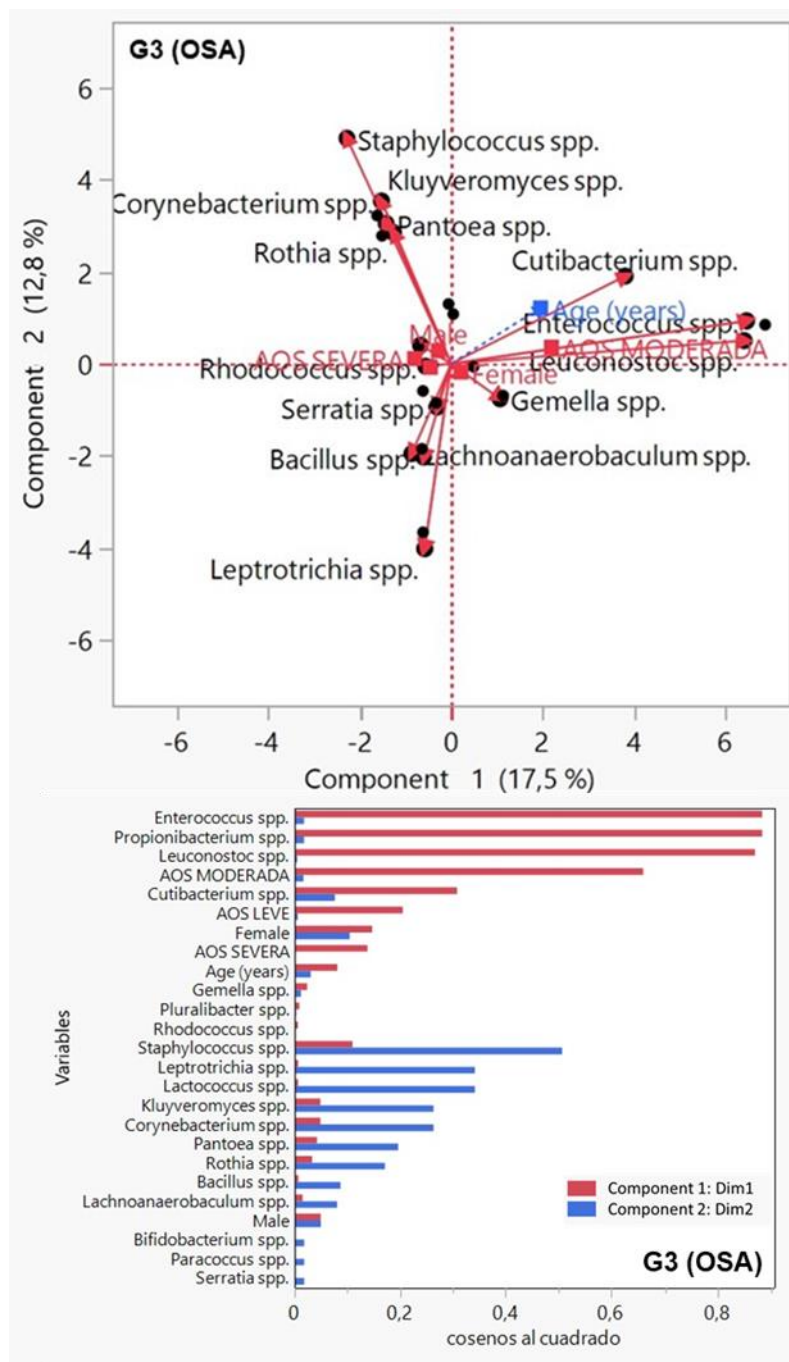


Figure S3. Principal Coordinates Analysis (PCoA) calculated by the relative abundance of microorganisms in G3 (OSA).

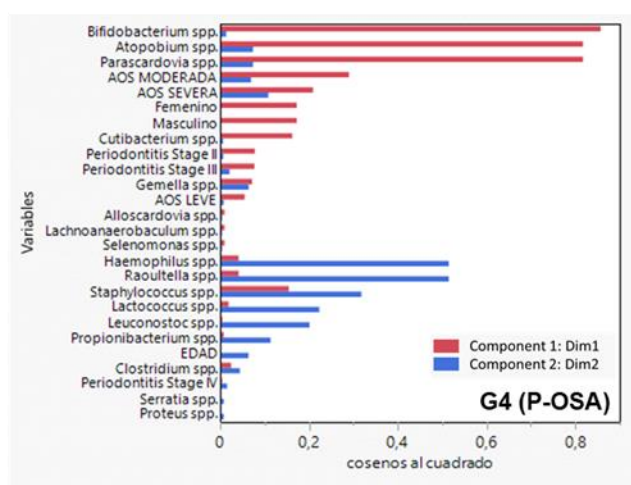
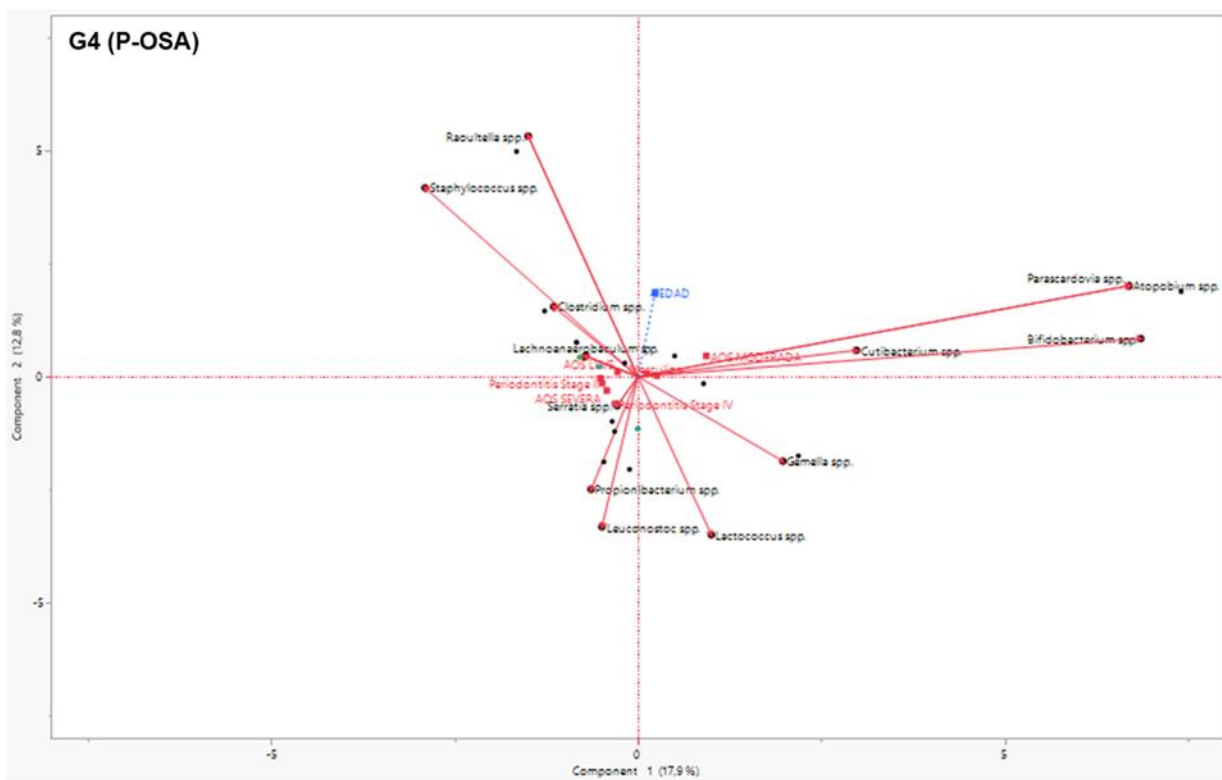


Figure S4. Principal Coordinates Analysis (PCoA) calculated by the relative abundance of microorganisms in G4 (P-OSA).

Table S1.

Species identified in each of group of patients

Species	G1 (H) (n=20)	G2 (P) (n=13)	G3 (OSA) (n=18)	G4 (P-OSA) (n=24)
	Percentage (%)			
<i>Alloscardovia omnicoles</i>	0	3.33	0	4.26
<i>Atopobium parvulum</i>	0	0	0	2.13
<i>Atopobium rimae</i>	0	3.33	0	0
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	0	0	2.50	0
<i>Bifidobacterium dentium</i>	1.89	0	2.50	8.51
<i>Clostridium histolyticum</i>	0	3.33	0	0
<i>Clostridium tertium</i>	0	0	0	2.13
<i>Corynebacterium durum</i>	0	0	2.50	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	1.89	0	0	0
<i>Cutibacterium acnes</i>	16.98	13.33	10.0	2.13
<i>Cutibacterium avidum</i>	0	0	0	2.13
<i>Cutibacterium granulosum</i>	0	3.33	0	8.51
<i>Enterococcus faecalis</i>	3.77	3.33	2.50	0
<i>Enterococcus gilvus</i>	1.89	0	0	0
<i>Gemella morbillorum</i>	3.77	0	2.50	2.13
<i>Gemella sanguinis</i>	5.66	0	0	0
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0	0	0	2.13
<i>Kluyveromyces lactis</i>	0	0	2.50	0
<i>Lachnoanaerobaculum saburreum</i>	1.89	0	5.00	2.13
<i>Lachnoanaerobaculum umeaense</i>	5.66	0	0	0
<i>Lactococcus garvieae</i>	1.89	0	0	4.26
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	0	2.13
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	0	0	2.50	2.13
<i>Leptotrichia buccalis</i>	0	0	2.50	0
<i>Leuconostoc citreum</i>	0	0	2.50	0
<i>Leuconostoc lactis</i>	1.89	0	0	2.13
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	0	5.00	4.26
<i>Megasphaera micronuciformi</i>	0	3.33	0	0
<i>Neisseria elongata</i>	0	6.67	0	0
<i>Neisseria oralis</i>	0	3.33	0	0
<i>Olsenella uli</i>	0	3.33	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	0	0	2.50	0
<i>Paracoccus denitrificans</i>	0	0	2.50	0

<i>Parascardovia denticolens</i>	0	3.33	0	2.13
<i>Pluralibacter gergoviae</i>	0	0	2.50	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	1.89	0	0	2.13
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	0	0	2.50	0
<i>Propionibacterium propionicum</i>	0	0	0	4.26
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	2.13
<i>Pseudopropionibacterium propionicum</i>	0	3.33	0	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	0	0	0	2.13
<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	0	3.33	0	0
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0	3.33	2.50	0
<i>Rothia aerea</i>	0	0	2.50	0
<i>Rothia dentocariosa</i>	5.66	0	0	0
<i>Rothia mucilaginoso</i>	1.89	0	5.00	0
<i>Selenomonas flueggei</i>	0	0	0	2.13
<i>Serratia liquefaciens</i>	0	0	2.50	2.13
<i>Staphylococcus argenteus</i>	0	0	5.00	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.32	6.67	5.00	6.38
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	0	2.50	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22.64	23.33	17.50	19.15
<i>Staphylococcus hominis</i>	1.89	10.00	0	2.13
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1.89	0	0	0
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1.89	0	2.50	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	3.77	0	2.50	4.26

Table S2.

Positive and negative correlations between the genera of microorganisms and periodontal parameters in each group of patients

Group of patients	Positive correlation with periodontal parameters	Negative correlation with periodontal parameters
G1	<i>Rothia</i> spp. vs. Missing teeth ($p=0.001$) <i>Lachnoanaerobaculum</i> spp. vs. PD ($p=0.047$) <i>Enterococcus</i> spp. vs. Sites (%) PD ($p=0.006$) <i>Leuconostoc</i> spp. vs. BOP% ($p=0.048$) <i>Staphylococcus</i> spp. vs. PI ($p=0.032$)	<i>Cutibacterium</i> spp. vs. Missing teeth ($p=0.005$) <i>Gemella</i> spp. vs. CAL ($p=0.032$)
G2	<i>Staphylococcus</i> spp. vs. BOP % ($p=0.026$)	
G3	<i>Lachnoanaerobaculum</i> spp. vs. CAL ($p>0.05$) <i>Bacillus</i> spp. vs. CAL ($p=0.051$) <i>Bifidobacterium</i> spp. vs. BOP% ($p=0.051$) <i>Pluralibacter</i> spp. vs. Teeth with periodontitis ($p=0.022$) <i>Rothia</i> spp. vs. PD ($p=0.011$) <i>Cutibacterium</i> spp. vs. Sites (%) PD ($p=0.030$)	<i>Leuconostoc</i> spp. vs. PD ($p=0.046$) <i>Leuconostoc</i> spp. vs. PI ($p=0.023$)
G4	<i>Proteus</i> spp. vs. Missing teeth ($p=0.048$) <i>Proteus</i> spp. vs. Sites (%) PD ($p=0.048$) <i>Proteus</i> spp. vs. CAL ($p=0.048$) <i>Serratia</i> spp. vs. Teeth with periodontitis ($p=0.048$) <i>Serratia</i> spp. vs. BOP% ($p=0.048$) <i>Serratia</i> spp. vs. PI ($p=0.048$)	<i>Lactococcus</i> spp. vs. Missing teeth ($p=0.008$) <i>Propionibacterium</i> spp. vs. Teeth with periodontitis ($p=0.003$) <i>Propionibacterium</i> spp. vs. PD ($p=0.003$) <i>Propionibacterium</i> spp. vs. Sites % PD ($p=0.003$) <i>Propionibacterium</i> spp. vs. CAL ($p=0.003$) <i>Propionibacterium</i> spp. vs. BOP% ($p=0.003$) <i>Propionibacterium</i> spp. vs. PI ($p=0.003$)

Artículo 3

Material suplementario

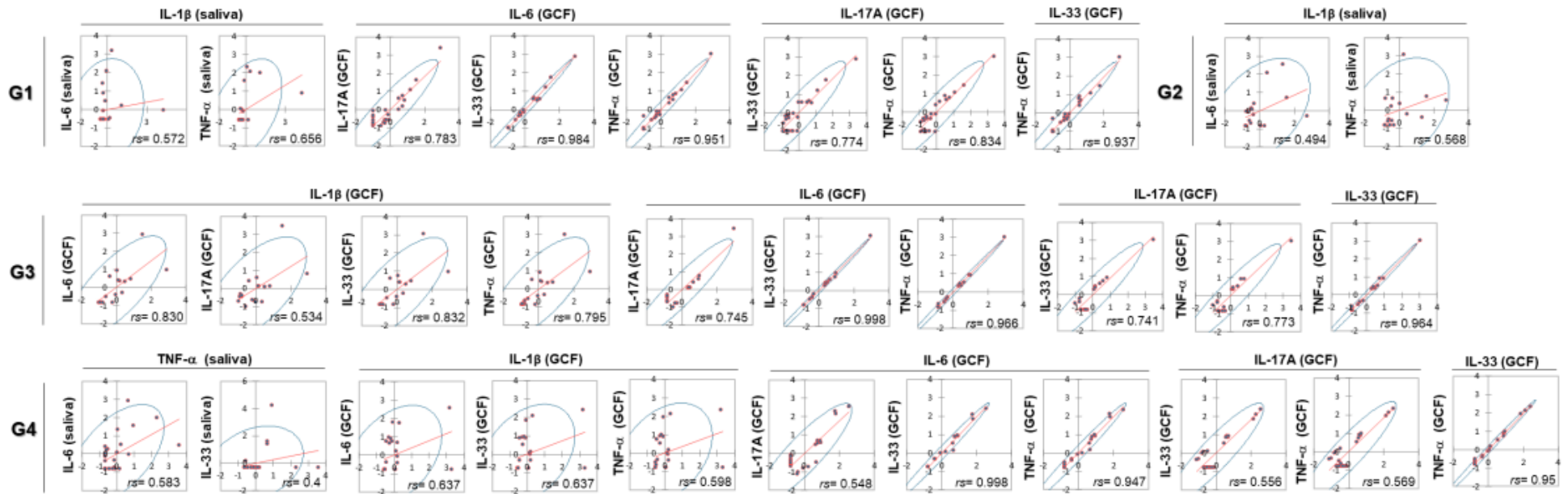
Biomarkers for the severity of periodontal disease in patients with obstructive sleep apnea: IL-1 β , IL-6, IL-17A, and IL-33

Figure S1. Scatter plot matrix of the statistical correlation in saliva and GCF concentrations of each cytokine of each group of patients. Each panel is a scatter plot of one cytokine against another cytokine. The trend lines are presented for each plot along with Spearman's rank correlation coefficient (r_s) and the red color of the data points in the scatter plots reveals a positive correlation. G1: Group 1 (H); G2: Group 2 (P); G3: Group 3 (OSA); G4: Group 4 (P-OSA). All correlations were statistically significant at a level of $p < 0.05$.

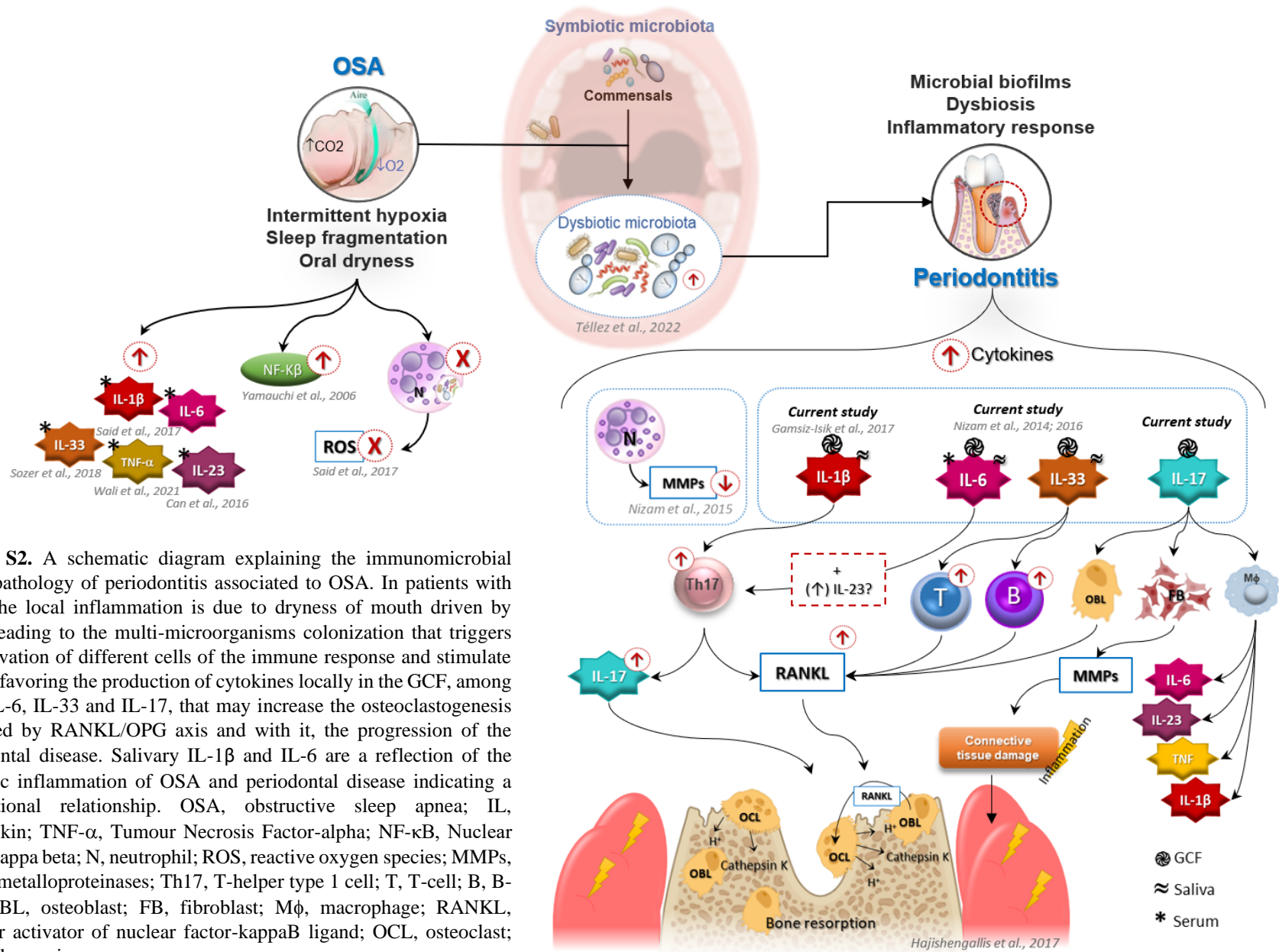


Figure S2. A schematic diagram explaining the immunomicrobial pathophysiology of periodontitis associated to OSA. In patients with OSA, the local inflammation is due to dryness of mouth driven by OSA, leading to the multi-microorganisms colonization that triggers the activation of different cells of the immune response and stimulate NF-κB favoring the production of cytokines locally in the GCF, among them IL-6, IL-33 and IL-17, that may increase the osteoclastogenesis mediated by RANKL/OPG axis and with it, the progression of the periodontal disease. Salivary IL-1β and IL-6 are a reflection of the systemic inflammation of OSA and periodontal disease indicating a bidirectional relationship. OSA, obstructive sleep apnea; IL, interleukin; TNF-α, Tumour Necrosis Factor-alpha; NF-κB, Nuclear factor kappa beta; N, neutrophil; ROS, reactive oxygen species; MMPs, matrix metalloproteinases; Th17, T-helper type 1 cell; T, T-cell; B, B-cell; OBL, osteoblast; FB, fibroblast; Mφ, macrophage; RANKL, receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand; OCL, osteoclast; H+, hydrogen ions.

Distinciones y participaciones en eventos científicos

2021. Premio del Programa "Para Mujeres en la Ciencia 2021". Expedida por Fundación L'Oreal, UNESCO, ICETEX y MinCiencias.

2020. IADR/AADR/CADR General Session. Participación en modalidad Poster. Título poster: ID3026: Oral Microbiota Associated with Obstructive Sleep Apnea and Periodontitis. Washington, D.C., USA.

2020. Encuentro Internacional de Investigación de Ingeniería de Tejidos. Participación en modalidad Presentación Oral. Título: "Caracterización de la microbiota oral asociada con Apnea Obstruktiva del Sueño en pacientes con periodontitis". Asunción, Paraguay.

2022. XXXII Encuentro Nacional de Investigación Odontológica ACFO. Participación en modalidad Presentación Oral. Título: "Relación de la AOS con la condición periodontal y sus factores de riesgo locales y sistémicos" Cali, Colombia.

2022. XXXII Encuentro Nacional de Investigación Odontológica ACFO. Participación en modalidad Presentación Oral. Título: "La Apnea Obstruktiva del Sueño favorece los factores predisponentes microbiológicos de la periodontitis" Cali, Colombia.

2022. XXXII Encuentro Nacional de Investigación Odontológica ACFO. Participación en modalidad Presentación Oral. Título: "Biomarcadores salivales y de fluido crevicular gingival asociados a periodontitis y apnea obstruktiva del sueño" Cali, Colombia