



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

Efectos de un gel nanoestructurado de cobre sobre la microbiota oral normal y la toxicidad a nivel sistémico: Un estudio metagenómico y nanotoxicológico *in vivo*.

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención
Microbiología

DAVID ESTEBAN MACHUCA ÁVILA
CONCEPCIÓN- CHILE
2024

Profesor Guía: Gabriela Sánchez Sanhueza
Departamento de Odontología Restauradora
Facultad de Odontología
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Gabriela Sánchez Sanhueza
Facultad de Odontología
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Celia Fernandes de Lima
Facultad de Odontología
Universidad de Concepción

Dr. Pablo Betancourt
Facultad de Odontología
Universidad de la Frontera

Director de Programa:

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

A mis padres, cuyo preocupación y compromiso han sido el motor silencioso de cada uno de mis logros. A mi hermana, por su apoyo firme, su sabiduría y por ser el empuje que necesitaba para llegar hasta aquí. A mi querida Catalina, por su ternura inagotable, por sostenerme en los días difíciles y celebrar conmigo cada pequeño avance.

© (2024), David Esteban Machuca Ávila

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han sido parte de este proceso y han contribuido, directa o indirectamente, a la realización de esta tesis. En primer lugar, agradezco profundamente a mi familia. A mis padres, por haberme inculcado desde pequeño el valor del estudio, la dedicación y la perseverancia. Su apoyo incondicional, en los momentos buenos y en los más difíciles, ha sido fundamental para llegar hasta aquí. A mi hermana, en quien más confío, por su compañía constante, su apoyo emocional y su disposición a estar presente durante todo este proceso. Agradezco de manera muy especial a la Dra. Gabriela Sánchez, quien creyó en mí desde el inicio, incluso antes de comenzar este magíster. Su guía, compromiso y apoyo constante, desde la postulación hasta la investigación misma, han sido claves para mi aprendizaje, permitiéndome avanzar en áreas que en un principio me parecían ajenas o complejas. Su rol como mentora ha marcado una diferencia invaluable en mi formación. Al Dr. Andrés Opazo, por su valioso acompañamiento como co-tutor de esta tesis. Al Dr. Gerardo González y a la Dra. Helia Bello, por su apoyo tanto como docentes como miembros del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos, aportando con sus conocimientos y experiencia a mi crecimiento académico y profesional. Agradezco también a María Fernanda Morales, por su disposición y colaboración durante el análisis bioinformático, el cual fue un componente esencial de este trabajo. Y por supuesto, a la familia del LIAA y a mis compañeros de magíster: Max, Victoria, Catalina, Fabián, Matías y Beatriz. Gracias por su buena disposición, apoyo y compañía a lo largo de esta etapa, así como por los buenos momentos compartidos que hicieron de este proceso una experiencia enriquecedora y significativa. A todos, gracias por haber sido parte de este camino.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Microbiota y microbioma oral humano	12
2.2. Metagenómica en el estudio del microbioma oral	14
2.3. Gen 16S rRNA como marcador taxonómico	15
2.4. Tecnologías de secuenciación de tercera generación y su aplicación en estudios del microbioma oral.....	18
2.5. Relevancia de las vías metabólicas funcionales en el microbioma oral 22	
2.6. Desafíos y estrategias en el manejo de la microbiota oral: perspectivas en el tratamiento de infecciones orales	24
2.7. Antisépticos bucales y su impacto en la microbiota oral	26
2.8. Nanopartículas de cobre en odontología	31
2.9. Efectos del entorno sobre propiedades de las nanopartículas de cobre 35	
2.10. Biomarcadores y medición de parámetros hematológicos como indicadores de toxicidad.....	37
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	42
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
4.1. Hipótesis	43
4.2. Objetivos	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	45
5.1. Materiales	45

5.2.	Metodología	46
6.	RESULTADOS.....	74
6.1.	Evaluación de la calidad y cantidad del ADN extraído y procesamiento de Librerías para Secuenciación.	74
6.2.	Calidad de Secuenciación Evaluada mediante PycoQC	82
6.3.	Asignación taxonómica con EMU	85
6.4.	Evaluación de la diversidad alfa.....	87
6.5.	Evaluación de la diversidad Beta	95
6.6.	Composición y estructura de la microbiota oral	98
6.7.	Análisis de vías metabólicas funcionales predictivas	121
6.8.	Resultados variaciones de peso corporal medidas a diario	135
6.9.	Resultados para los pesos de órganos internos	136
6.10.	Resultados consumo de alimentos por grupo de tratamiento....	140
6.11.	Resultados generales análisis sanguíneos	143
6.12.	Actividad ALT medida mediante kit colorimétrico y análisis estadístico	157
6.13.	Resultados análisis por TEM y SEM EDS	160
7.	DISCUSIÓN	163
8.	CONCLUSIONES	193
9.	PROYECCIONES	195
10.	GLOSARIO.....	197
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	198
12.	ANEXOS.....	222

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición mineral de la dieta estándar Prolab® Laboratory Rodent Diet RMH 3000 5P00.	49
Tabla 2. Resumen de los parámetros hematológicos, incluyendo analitos de la serie roja y serie blanca, junto con los parámetros bioquímicos analizados en las muestras.	57
Tabla 3. Tabla de cuantificación y caracterización del ADN para la muestra R1CONTROL del grupo Control.	77
Tabla 4. Tabla de cuantificación y caracterización del ADN para la muestra R2CHX7d del grupo tratado con Clorhexidina al 2% durante 7 días.	79
Tabla 5. Tabla de cuantificación y caracterización del ADN para la muestra R1NG7d.	80
Tabla 6. Tabla de cuantificación y caracterización del ADN para la muestra R1NG30d.	82
Tabla 7. Resumen de los resultados de asignación de lecturas a taxones utilizando EMU para cada muestra.	87
Tabla 8. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk aplicada a las métricas de diversidad alfa en los diferentes grupos de tratamiento. Los valores del estadístico W y los p-valores se presentan para cada grupo y métrica evaluada.	88
Tabla 9. Resultados de la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas entre los grupos en las diferentes métricas de diversidad alfa.	89
Tabla 10. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas entre los cuatro grupos en las métricas de diversidad alfa.	90
Tabla 11. Resultados de la prueba de Wilcoxon para comparar la métrica de equidad (Evenness) entre los grupos CONTROL y NG30d.	90
Tabla 12. Pruebas estadísticas PERMANOVA y pairwise PERMANOVA para la diversidad beta.	98
Tabla 13. Pruebas estadísticas de normalidad (Shapiro-Wilk: W y p), homogeneidad de varianzas (p de Levene) y diferencias significativas (ANOVA y Kruskal-Wallis, según corresponda) en el peso de órganos internos según grupo de tratamiento.	138
Tabla 14. Promedio y desviación estándar del peso de órganos internos en ratas según grupo de tratamiento.	139
Tabla 15. Resultados de las comparaciones estadísticas entre pares de grupos para el peso de órganos internos.	142
Tabla 16. Resultados de las pruebas estadísticas realizadas para las variables sanguíneas.	146

Tabla 17. Resultados del análisis post hoc para variables significativas identificadas en el análisis post hoc (Tukey o Dunn, según el caso) junto con los valores p ajustados (p_{aj}).....	147
Tabla 18. Valores promedio y desviaciones estándar de parámetros hematológicos relacionados con la serie roja.	148
Tabla 19. Valores promedio y desviaciones estándar de parámetros hematológicos relacionados con la serie blanca.....	151
Tabla 20. Valores promedio y desviaciones estándar (S.D) de parámetros bioquímicos sanguíneos..	155
Tabla 21. Representación de los 9 géneros más abundantes por grupo experimental, mostrando la abundancia total, la clasificación según tinción Gram y los requerimientos de oxígeno. Abreviaturas: FA, facultativo anaerobio; OA, obligado aerobio; MA, microaerófilico; OAn, obligado anaerobio..	225
Tabla 22. Distribución porcentual de la clasificación Gram en función de la abundancia total por grupo experimental.	226
Tabla 23. Índices de diversidad alfa para cada una de las muestras experimentales de microbiota oral de ratas tratadas.	228
Tabla 24. Valores promedio, número de muestras (N) y rangos de referencia para parámetros hematológicos en ratas Sprague-Dawley machos de 8 a 12 semanas de edad, obtenidos del laboratorio Charles River.....	229
Tabla 25. Valores promedio, número de muestras (N) y rangos de referencia para parámetros hematológicos en ratas Sprague-Dawley machos de 8 a 12 semanas de edad, obtenidos del laboratorio Charles River.....	230

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de acción de nanopartículas de cobre (NPCu) funcionalizadas en matriz PVP/PVA sobre estructuras bacterianas.....	32
Figura 2. Micrográficas SEM e imágenes AFM para Cu/1P-gel. Micrográficas SEM de la superficie y sección transversal, reconstrucción AFM 3D e imagen de fase original 3x3 µm 1.0-Cu/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.	45
Figura 3. Análisis por Microscopía Electrónica de transmisión (TEM) para para 1.0-Cu/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.	46
Figura 4. Esquema general de las metodologías empleadas en este estudio.	47
Figura 5. Distribución de ratas por jaula n = 4 individuos. Ciclos de luz oscuridad de 12 horas diarias.	48
Figura 6. Procedimiento para la aplicación de tratamientos según grupo.....	52
Figura 7. Recolección de muestras y almacenamiento a -80°C.....	55
Figura 8. Procedimientos de eutanasias y disección. A) Obtención de sangre mediante punción cardíaca (10 mL) para análisis hematológicos y bioquímicos. B) Extracción y procesamiento de órganos (hígado, riñones, bazo y corazón), incluyendo medición de peso y tamaño para comparar entre grupos experimentales y controles.	58
Figura 9. Visualización de los productos de amplificación del gen 16s rRNA (1500bp aprox.) mediante PCR. A) 1. Marcador de peso molecular, 2. R1CHX7d, 3. R2CHX7d, 4. R4CHX7d, 5. R1NG7d, 6. R2NG7d, 7. R3NG7d, 8. Control positivo. B) 1). Marcador de peso molecular, 2. R1CONTROL, 3. R2CONTROL, 4. R3CONTROL, 5. R1NG30d, 6. R2NG30d, 7. R3NG30d, 8. Control positivo, 9. Control Negativo..	76
Figura 10. Electroferograma del perfil de intensidad de ADN tras la limpieza de librerías para la muestra R1CONTROL.	77
Figura 11. Electroferograma del perfil de intensidad de ADN obtenido tras limpieza de librerías para la muestra R2CHX7d..	78
Figura 12. Electroferograma del del perfil de intensidad de ADN obtenido tras limpieza de librerías para la muestra R1NG7d.	79
Figura 13. Electroferograma representativo de la cuantificación de ADN en la muestra R1NG30d del grupo tratado con nanopartículas de cobre durante 30 días (NG30d).	81
Figura 14. Gráfico de la distribución de densidad de los puntajes de calidad PHRED de las lecturas que pasaron los filtros de calidad durante la secuenciación..	84

Figura 15. Gráfico de relación entre los puntajes de calidad PHRED y la longitud de las lecturas basecall en las lecturas que pasaron los filtros de calidad (Pass reads).....	84
Figura 16. <i>Boxplots</i> para las métricas de riqueza Chao1 (A) y Richness (B) en los diferentes grupos de tratamiento (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d). ...	91
Figura 17. <i>Boxplots</i> que ilustran las métricas de diversidad alfa basadas en los índices de Shannon (A) y Simpson (B) para los diferentes grupos de tratamiento (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d)..	92
Figura 18. <i>Boxplot</i> que representa los valores del índice de uniformidad de Pielou (Evenness) para los diferentes grupos de tratamiento (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d).	93
Figura 19. Curvas de rarefacción generadas para las muestras de los distintos grupos de tratamiento (CHX7d, NG7d, CONTROL, y NG30d) de la microbiota oral de las ratas..	94
Figura 20. Análisis de coordenadas principales (PCoA). (A) PCoA basado en Bray-Curtis mostrando diferencias en la abundancia relativa. (B) PCoA basado en Jaccard, centrado en la presencia/ausencia de taxones. Los colores representan los distintos grupos experimentales.....	96
Figura 21. Análisis jerárquico y de disimilitud. A) Dendrograma basado en distancias Bray-Curtis. B) Heatmap de distancias de Jaccard.....	97
Figura 22. Composición taxonómica a nivel de phylum y clase en los diferentes grupos de estudio. (A) Distribución de los phyla bacterianos por grupos. (B) Distribución de las principales clases bacterianas en cada grupo..	99
Figura 23. Gráfico circular que representa la composición taxonómica de la microbiota oral del grupo control. Se muestran proporciones a nivel de <i>phylum</i> , clase, orden, familia y género.	101
Figura 24. Gráfico circular que representa la composición taxonómica de la microbiota oral del grupo CHX7d. Se muestran proporciones a nivel de <i>phylum</i> , clase, orden, familia y género.	102
Figura 25. Gráfico circular que representa la composición taxonómica de la microbiota oral del grupo NG7d. Se muestran proporciones a nivel de <i>phylum</i> , clase, orden, familia y género.	103
Figura 26. Pie chart que representa la distribución taxonómica de la microbiota oral del grupo NG30d. Se muestran proporciones a nivel de <i>phylum</i> , clase, orden, familia y género.....	104
Figura 27. Distribución de los phyla bacterianos por muestras individuales.	106
Figura 28. Distribución de la abundancia relativa de familias bacterianas más abundantes en la microbiota oral de cada individuo por grupo.	107

Figura 29. Distribución de la abundancia relativa de los géneros y phylum bacterianos más prevalentes en la microbiota oral de cada individuo por grupo..	109
Figura 30. Distribución de la abundancia relativa de las familias y géneros bacterianos prevalentes en la microbiota oral de cada individuo.	110
Figura 31. Distribución de la abundancia relativa de los géneros y especies bacterianas más prevalentes en la microbiota oral de los diferentes grupos de tratamiento.	112
Figura 32. Diagramas de Venn que muestran la cantidad de familias, géneros y especies bacterianas compartidas entre los cuatro grupos de estudio. A) Familias compartidas (6). B) Géneros compartidos (6). C) Especies compartidas (8)..	114
Figura 33. Heatmap tree de la composición taxonómica para el grupo control. Variación de colores desde púrpura (mayor abundancia) a naranja (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (<i>n_obs</i>) asociadas a cada nodo.	116
Figura 34. Heatmap tree para el grupo CHX7d. Variación de colores desde púrpura (mayor abundancia) a amarillo (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (<i>n_obs</i>) asociadas a cada nodo.	118
Figura 35. Heatmap <i>tree</i> para el grupo (NG7d). Variación de colores desde verde oscuro (mayor abundancia) a amarillo y gris (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (<i>n_obs</i>) asociadas a cada nodo.	119
Figura 36. Heatmap <i>tree</i> para el grupo (NG30d). Variación de colores desde azul oscuro (mayor abundancia) a verde agua (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (<i>n_obs</i>) asociadas a cada nodo.	120
Figura 37. Representación gráfica del análisis funcional de vías metabólicas por grupo mediante PCA.	123
Figura 38. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos CHX7d y NG7d.	125
Figura 39. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos CHX7d y NG30d.	126
Figura 40. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos Control y NG7d.	128
Figura 41. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos Control y NG30d.	129
Figura 42. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 3 entre los grupos CHX7d y NG7d.	131
Figura 43. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 3 entre los grupos CHX7d y NG30d.	132
Figura 44. Comparación de la proporción media de la vía de reducción de nitrato a nitrito entre los grupos experimentales.	133

Figura 45. Representación esquemática de la vía de desnitrificación desde el nitrato hasta el nitrógeno molecular..	134
Figura 46. Variación diaria del peso corporal (%) en ratas (R1, R2, R3 y R4) según grupo de tratamiento. La línea roja punteada indica el umbral de -20%, considerado como una disminución significativa del peso corporal.	136
Figura 47. Boxplots de las distribuciones de los pesos (g) de los órganos internos medidos para cada uno de los grupos de estudio (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d). Se observan las distribuciones para el peso de Bazo (A), Corazón (B), Riñones (C) e Hígado (D).	140
Figura 48. Distribución del consumo de alimento (g) por grupo de estudio (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d.	143
Figura 49. Comparación de la actividad de alanina aminotransferasa (ALT) en los diferentes grupos experimentales. (A) Distribución de la actividad ALT (mU/mL) en los grupos NG7d, CHX7d, Control y NG30d. (B) Gráfico de barras para la media de la actividad ALT (mU/mL) incluyendo un grupo Control positivo como referencia.	158
Figura 50. Curva estándar de piruvato utilizada para la determinación de actividad ALT. Se presenta la relación lineal entre la concentración de piruvato (nmoles) y la absorbancia medida a 570 nm (ΔA_{570} , unidades de densidad óptica).	159
Figura 51. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del suero sanguíneo de ratas expuestas a nanopartículas de cobre. Las flechas señalan nanopartículas identificadas en las muestras: (a-c) R1NG7d, (d-f) R1NG30d, (g-h) R2NG7d, y (i-k) R4NG7d.	161
Figura 52. Microscopía electrónica de barrido SEM-EDS, para la detección de elementos químicos metálicos con un índice de refracción específico para cobre.	162
Figura 66. Análisis jerárquico de disimilitud. Dendrograma basado en distancias euclidianas generado mediante el método de enlace completo ('complete linkage').	223
Figura 67. Análisis jerárquico de disimilitud. Dendrograma basado en el índice de similitud de Jaccard, utilizando el método de enlace completo ('complete linkage').	224
Figura 68. Distribución porcentual de bacterias Gram positivas y Gram negativas en la microbiota oral de ratas Sprague-Dawley según el grupo de tratamiento.	227

RESUMEN

Introducción: La clorhexidina (CHX), un antiséptico bucal de referencia presenta efectos antimicrobianos amplios que alteran la microbiota oral, disminuyendo bacterias beneficiosas esenciales para la homeostasis oral y la salud sistémica. Por otro lado, las nanopartículas de cobre (CuNPs) ofrecen propiedades antimicrobianas específicas, con menor probabilidad de inducir resistencia y efectos colaterales, constituyéndose como una alternativa terapéutica prometedora.

Objetivo: Evaluar los efectos de un gel basado en CuNPs sobre la microbiota oral, sus vías metabólicas funcionales y la seguridad sistémica, comparándolo con CHX en un modelo experimental de ratas Sprague-Dawley.

Métodos: Se incluyeron 16 ratas divididas en cuatro grupos: control, CHX por 7 días (CHX7d), CuNPs por 7 días (NG7d) y CuNPs por 30 días (NG30d). La microbiota oral fue caracterizada mediante secuenciación del gen 16S rRNA de longitud completa (Oxford Nanopore) y análisis bioinformático con PICRUST2 y EMU. Además, se evaluaron parámetros hematológicos, bioquímicos y enzimáticos (ALT) para determinar toxicidad sistémica. La presencia de CuNPs en sangre y tejidos se analizó mediante TEM y SEM-EDS.

Resultados: Los tratamientos con CuNPs preservaron la diversidad microbiana relativa y potenciaron rutas metabólicas clave como la reducción de nitrato a

nitrito en NG7d y NG30d, favoreciendo funciones bacterianas relacionadas con la homeostasis metabólica. CHX mostró un impacto más amplio, disminuyendo la diversidad alfa y afectando negativamente la estructura de la microbiota. En términos de seguridad sistémica, ningún grupo mostró pérdida significativa de peso ni alteraciones en el peso de órganos internos. Los parámetros hematológicos y bioquímicos permanecieron mayoritariamente dentro de rangos fisiológicos. Sin embargo, las imágenes TEM confirmaron la presencia de CuNPs en suero, mientras que SEM-EDS no detectó acumulación en tejidos renales.

Conclusiones: El gel basado en CuNPs demostró un efecto antimicrobiano selectivo y preservó la seguridad sistémica en este modelo experimental. Estos hallazgos subrayan el potencial de las CuNPs como alternativa terapéutica en odontología, abordando las preocupaciones globales sobre la resistencia antimicrobiana y ofreciendo una estrategia eficaz que preserva funciones microbianas esenciales.

ABSTRACT

Introduction: Chlorhexidine (CHX), a standard oral antiseptic, exerts broad-spectrum antimicrobial effects that disrupt the oral microbiota, reducing beneficial bacteria essential for oral and systemic health. Copper nanoparticles (CuNPs) provide targeted antimicrobial properties with a lower likelihood of inducing resistance, presenting a promising therapeutic alternative.

Objective: To evaluate the effects of a CuNP-based gel on oral microbiota composition, functional metabolic pathways, and systemic safety compared to CHX in a Sprague-Dawley rat model.

Methods: Sixteen rats were divided into four groups: control, CHX for 7 days (CHX7d), CuNPs for 7 days (NG7d), and CuNPs for 30 days (NG30d). The oral microbiota was characterized using full-length 16S rRNA sequencing (Oxford Nanopore) and bioinformatic analysis with PICRUSt2 and EMU. Hematological, biochemical, and enzymatic parameters (ALT) were evaluated to determine systemic toxicity. CuNP presence in blood and tissues was analyzed via TEM and SEM-EDS imaging.

Results: CuNP treatments preserved relative microbial diversity and enhanced key metabolic pathways, such as nitrate-to-nitrite reduction, in NG7d and NG30d, supporting bacterial functions associated with metabolic homeostasis. CHX demonstrated broader impacts, reducing alpha diversity and negatively affecting microbiota structure. In terms of systemic safety, no significant weight loss or

organ weight changes were observed across groups. Hematological and biochemical parameters remained mostly within physiological ranges. However, TEM images confirmed CuNP presence in serum, while SEM-EDS showed no renal tissue accumulation.

Conclusions: The CuNP-based gel demonstrated selective antimicrobial efficacy and preserved systemic safety in this experimental model. These findings highlight the potential of CuNPs as a therapeutic alternative in dentistry, addressing global concerns about antimicrobial resistance while preserving essential microbial functions.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento alarmante de la resistencia antimicrobiana y la generación de resistencia cruzada a compuestos como la clorhexidina (CHX) han planteado desafíos críticos en el manejo de infecciones orales. Aunque la CHX sigue siendo el estándar de referencia como antiséptico bucal, su uso prolongado se asocia con efectos secundarios significativos, incluida la alteración de la microbiota oral saludable, el aumento de la susceptibilidad a disbiosis y el surgimiento de microorganismos resistentes. Este panorama enfatiza la necesidad de explorar alternativas más seguras y eficaces que superen estas limitaciones.

En este contexto, las nanopartículas de cobre (NPCu) funcionalizadas se posicionan como una solución prometedora, combinando propiedades antimicrobianas potentes con una potencial reducción en la generación de resistencia bacteriana. Este trabajo presenta la evaluación luego del anterior desarrollo de un gel nanoestructurado basado en NPCu estabilizadas con Polivinilpirrolidona (PVP) y Polivinilalcohol (PVA), sintetizado mediante un método asistido por microondas. Con un tamaño promedio de partículas de 10.21 ± 3.76 nm, esta formulación se diseñó para maximizar la interacción con microorganismos orales de tal manera de mantener un efecto antibacteriano marcado y reduciendo la citotoxicidad en el tejido del hospedero.

La propuesta de valor de esta investigación radica en su enfoque integrado para evaluar los efectos antibacterianos sobre el microbioma oral y sistémicos de las

NPCu. Utilizando un modelo animal de ratas Sprague-Dawley, se exploraron de manera comparativa los impactos del gel de NPCu y la CHX sobre la microbiota oral y la salud sistémica. La caracterización incluyó análisis avanzados de composición, estructura y funciones metabólicas predictivas de la microbiota oral, así como una evaluación exhaustiva de parámetros hematológicos, bioquímicos y de toxicidad hepática mediante ensayos de alanina aminotransferasa (ALT).

Este estudio se distingue por su metodología rigurosa, que combina tecnologías de secuenciación de tercera generación y análisis bioinformáticos junto con técnicas de microscopía electrónica para evaluar la presencia y eliminación de las NPCu a nivel sistémico. Los resultados de esta investigación no solo destacan el potencial de las nanopartículas de cobre (NPCu) como una alternativa terapéutica innovadora en odontología, sino que también abordan preocupaciones globales relacionadas con la resistencia antimicrobiana. Este estudio evidencia que las NPCu, al diferir en su mecanismo de acción respecto a agentes antimicrobianos tradicionales como la clorhexidina, podrían ofrecer una estrategia eficaz que minimice el riesgo de resistencia cruzada. La clorhexidina, ampliamente utilizada como antiséptico oral, ha sido vinculada en investigaciones previas con la selección de microorganismos resistentes, lo que subraya la urgencia de explorar alternativas más sostenibles. En este contexto, el gel funcionalizado de NPCu desarrollado y probado en este trabajo demuestra no solo un impacto antimicrobiano selectivo sobre la microbiota oral, sino también una seguridad sistémica alentadora, proyectándose como una herramienta

prometedora para su implementación clínica en escenarios de alta prevalencia de resistencia antimicrobiana donde incluso el contexto odontológico no escapa a esta problemática.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Microbiota y microbioma oral humano

La complejidad de la microbiota bucal abarca una variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, arqueas y virus, formando una comunidad intrincada. Esta diversidad contribuye a una biogeografía distintiva, la cual, junto con las interacciones con el sistema inmune del hospedero, juega un papel crucial tanto en la salud oral como en la salud general del organismo. (J. L. Baker et al., 2024, Sedghi et al., 2021a, J. Wang et al., 2022) Actualmente, se sabe que la cavidad oral alberga una microbiota extremadamente variada, solamente superada en diversidad por la microbiota del colon. Basado en estudios de microbioma, se estima que una persona en promedio contiene entre 100 y 300 tipos distintos de especies bacterianas habiéndose descrito un total de más de 700 especies que se han identificado hasta la fecha. (Sato et al., 2015, Bik et al., 2010). Este conjunto de organismos alberga su propio contenido genético, denominado “metagenoma”, el cual sostiene una relación recíproca o bidireccional con el genoma humano, esencial tanto para la preservación de la salud como para el desarrollo de enfermedades. (Levy et al., 2015) Se ha descrito que la microbiota bucal es clave en el desarrollo de caries y periodontitis, dos enfermedades comunes y altamente prevalentes en la población adulta a nivel mundial. Estas patologías orales, sin el tratamiento adecuado, pueden llevar a la pérdida de dientes y de la correcta función masticatoria, generar déficit

nutricionales y reducir la calidad de vida en general.(Tonetti et al., 2017, Valm, 2019).

Por otra parte, es importante tener en cuenta que tanto los estados de salud como los de enfermedad a nivel oral pueden ser el reflejo de la composición y función de la microbiota bucal junto con la influencia de las interacciones que se producen entre especies dentro de este ambiente.(Valm, 2019) En este sentido, la microbiota se desenvuelve en un ambiente microbiano muy dinámico, con diferentes sustratos y nichos que favorecen el desarrollo de complejas biopelículas polimicrobianas en las superficies dentales.(Sedghi et al., 2021a)(Duran-Pinedo & Frias-Lopez, 2015) La estabilidad de este ecosistema se ve continuamente desafiada por factores dietéticos, flujo salival, la masticación y la introducción de microorganismos exógenos. Así mismo, la composición de esta microbiota puede estar influenciada por la genética del individuo, factores maternos y ambientales, como la alimentación y la higiene oral, además de medicamentos y condiciones sistémicas.(Duran-Pinedo & Frias-Lopez, 2015) Esta dinámica ofrece un terreno fértil para la disbiosis y enfermedades orales anteriormente nombradas. Es por todo esto, que la investigación mediante métodos *in vitro* independientes de cultivos junto con análisis con nuevas tecnologías de secuenciación genómica han permitido profundizar en la comprensión de estas comunidades microbianas de la cavidad bucal al igual que las variables que afectan la dinámica del microbioma oral.(Sedghi et al., 2021a)

2.2. Metagenómica en el estudio del microbioma oral

Es importante tener presente que la metagenómica analiza el ácido desoxirribonucleico (ADN) directo de entornos mixtos, revelando la diversidad y abundancia de microorganismos.(Knight et al., 2018) Recientes metodologías y herramientas bioinformáticas han optimizado el estudio del microbioma, permitiendo desde análisis de diversidad hasta la predicción de vías metabólicas.(Douglas et al., 2020a)(Muir et al., 2016) Las tecnologías de secuenciación de tercera generación, con su capacidad para obtener genomas completos desde muestras complejas, auguran un gran avance, simplificando la identificación de genomas circulares completos y abriendo la puerta a la genómica de alta precisión en el estudio del microbioma. (J. L. Baker, 2023) Es así como la metagenómica ha transformado gran parte de la comprensión del microbioma oral en los últimos años.

La llegada de la secuenciación masiva ha permitido indagar en la microbiota bucal con una profundidad antes inimaginable.(Duran-Pinedo & Frias-Lopez, 2015) En especial, la secuenciación del *16S rRNA* se ha consolidado como una herramienta fundamental para el estudio detallado de las comunidades procarióticas. (Willis & Gabaldón, 2020)(Knight et al, 2018) Avanzando en este campo, se ha demostrado que la obtención de genomas de referencia de alta calidad es vital por múltiples motivos.(J. L. Baker, 2022) Primero, posibilitan la cuantificación precisa de la abundancia de taxones específicos o de sus transcripciones de ARNm a través del mapeo de lecturas(Venter et al, 2004).

Además, la posesión de un genoma completo facilita la predicción de funciones metabólicas y roles ecológicos, algo sumamente relevante para especies que aún no han sido aisladas o cultivadas (Fleischmann et al., 1995) Estos genomas de alta fidelidad también son cruciales para dirigir la experimentación en laboratorio, como la edición genómica y la mutagénesis. No obstante, a pesar de la creciente acumulación de genomas microbianos en bases de datos como NCBI RefSeq (O’Leary et al., 2016) y la Human Oral Microbiome Database (HOMD) (Chen et al., 2010), muchas bacterias, incluyendo aquellas pertenecientes al microbioma oral humano, aún no cuentan con genomas de referencia bien establecidos.(J. L. Baker, 2022)(Naito et al., 2016)

La revolución en la secuenciación masiva de segunda generación a partir de la utilización de Illumina ha profundizado el entendimiento del microbioma oral, aunque las lecturas cortas limitan el ensamblaje de genomas. Las tecnologías emergentes como Oxford Nanopore (Jain et al., 2015) y PacBio ofrecen lecturas más largas que superan estas limitaciones y facilitan el análisis genómico completo y la caracterización epigenética.(Roberts et al., 2013)(Athanasopoulou et al., 2021)(Baker et al., 2023)

2.3. Gen 16S rRNA como marcador taxonómico

El gen *16S rRNA* se ha establecido como una macromolécula de alto interés en filogenética y taxonomía de microorganismos procariotas, gracias a su estructura que intercala regiones conservadas universales entre diferentes

microorganismos con segmentos variables que evolucionan a lo largo del tiempo.(Rodicio & Mendoza, 2004) Este gen presenta diez zonas conservadas, de C1 a C10, que son fundamentales para el diseño de cebadores universales que facilitan la amplificación de las regiones hipervariables. Paralelamente, las nueve regiones variables, etiquetadas de V1 a V9, son las que aportan la información crítica para profundizar en los estudios de filogenia y taxonomía.(Regueira-Iglesias, Balsa-Castro, et al., 2023a)(Regueira-Iglesias, Vázquez-González, et al., 2023a)

El tamaño promedio del gen *16S rRNA* se encuentra alrededor de los 1500 pares de bases, sirviendo las secuencias de *Escherichia coli* como referencia estándar para definir la ubicación de los nucleótidos dentro del gen, así como para la identificación y nomenclatura de los cebadores específicos.(Regueira-Iglesias, Vázquez-González, et al., 2023a) No obstante, es relevante mencionar que la extensión total del gen y la distribución de sus regiones conservadas y variables exhiben una notable variabilidad entre distintas especies de bacterias y arqueas, e incluso entre cepas dentro de una misma especie. Esta variabilidad plantea desafíos en la delimitación precisa de las posiciones de inicio y fin de las regiones variables y conservadas, dependiendo siempre de la secuencia de referencia empleada para el análisis.(G. C. Baker et al., 2003)

A pesar de la existencia de otros marcadores moleculares como el gen de la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*), el gen *16S rRNA* es mayoritariamente

utilizado.(Rodicio & Mendoza, 2004) Su presencia universal en todas las bacterias y arqueas, junto con una combinación óptima de estabilidad en sus regiones conservadas e hipervariables, hace que este gen sea adecuado para propósitos bioinformáticos y alineamientos precisos. Además, la amplia base de datos disponibles y la facilidad de secuenciación subrayan su utilidad en la investigación científica.(Regueira-Iglesias, Balsa-Castro, et al., 2023a) Sin embargo, la utilidad del gen *16S rRNA* como marcador filogenético exhibe limitaciones. Una de las más significativas es la presencia de múltiples copias en un mismo genoma, lo que complica la cuantificación de la abundancia de taxones específicos y puede llevar a una sobreestimación o subestimación de ciertos microorganismos. Este fenómeno se observa en un gran porcentaje de bacterias y arqueas orales, donde el número de copias del gen varía ampliamente. A esto se suma la variabilidad intragenómica, donde diferentes copias del gen *16S* dentro de un mismo organismo pueden mostrar secuencias distintas, lo que potencialmente podría llevar a una clasificación errónea de las secuencias en taxones incorrectos.(Regueira-Iglesias, Balsa-Castro, et al., 2023a)(Regueira-Iglesias, Vázquez-González, et al., 2023a)

Para abordar estos desafíos, se han desarrollado diversas estrategias bioinformáticas que intentan ajustar estas variaciones en el número de copias del gen, aunque la precisión de estos métodos está intrínsecamente ligada a la calidad y amplitud de las bases de datos de referencia utilizadas. (Weinroth et al., 2022) Este conjunto de características complejiza el uso del gen *16S rRNA* como

herramienta filogenética, pero también subraya su relevancia en el estudio del microbioma.(Regueira-Iglesias, Balsa-Castro, et al., 2023a)

2.4. Tecnologías de secuenciación de tercera generación y su aplicación en estudios del microbioma oral

Tal como hemos dado a entender anteriormente, la microbiota oral es una de las comunidades microbianas más complejas del cuerpo humano, lo que resalta la necesidad de herramientas analíticas capaces de resolver su diversidad y funcionalidad con precisión. En este contexto, las tecnologías de secuenciación de tercera generación, como Oxford Nanopore Technologies (ONT) y Pacific Biosciences (PacBio), han marcado un cambio de paradigma en los estudios del microbioma (Pérez-Cobas et al., 2020). Estas plataformas, al ofrecer longitudes de lecturas largas, permiten la secuenciación completa del gen *16S rRNA*, superando las limitaciones de tecnologías previas basadas en lecturas cortas, como Illumina. Esta capacidad es particularmente significativa en el microbioma oral, donde la redundancia y variabilidad intragenómica complican la interpretación taxonómica y funcional, mientras que la resolución a nivel de especie puede ser determinante para responder preguntas biológicas críticas.(Regueira-Iglesias, Vázquez-González, et al., 2023b)

En el caso específico de ONT, su capacidad para secuenciar en tiempo real y cubrir regiones completas del gen *16S rRNA*, incluidas las hipervariables V1-V9, permite abordar de manera más precisa las interacciones ecológicas dentro del

microbioma oral. (Santos et al., 2020) Esta tecnología se complementa con herramientas bioinformáticas avanzadas como NanoCLUST (Rodríguez-Pérez et al., 2021) y Emu (Curry et al., 2022), que optimizan la clasificación taxonómica a nivel de especie y minimizan los errores asociados con las lecturas largas. NanoCLUST, por ejemplo, emplea agrupamiento no supervisado mediante UMAP y HDBSCAN, junto con técnicas de refinamiento como Medaka y FastANI, para generar perfiles taxonómicos confiables en comunidades bacterianas complejas. Estas capacidades aseguran que las lecturas completas del gen 16S se traduzcan en datos robustos y detallados.(Rodríguez-Pérez et al., 2021)

Por su parte, Emu utiliza un enfoque innovador basado en un algoritmo de maximización de expectativas (EM). Este modelo probabilístico corrige errores de asignación taxonómica, un desafío común en lecturas largas de ONT, donde las tasas de error pueden superar el 10%. El algoritmo de Emu refina iterativamente las probabilidades de mapeo de lecturas, reduciendo significativamente los falsos positivos y negativos, y permitiendo la distinción precisa entre especies estrechamente relacionadas.(Curry et al., 2022) En estudios de comunidades simuladas y muestras clínicas, Emu ha demostrado superar a herramientas como Kraken2 (Wood et al., 2019) y Centrifuge en precisión a nivel de especie, incluso al trabajar con bases de datos incompletas. Este enfoque es especialmente relevante para el análisis del microbioma oral, donde muchas especies aún no están completamente caracterizadas.(Curry et al., 2024)

Estas herramientas han sido fundamentales en este estudio, donde la resolución taxonómica a nivel de especie resulta ser relevante al evaluar cambios inducidos por tratamientos antibacterianos en la microbiota oral. El uso de EMU ha permitido una integración más precisa entre composición taxonómica y funciones metabólicas clave, facilitando un entendimiento más completo de las dinámicas ecológicas y funcionales que se presentan en la salud bucal.

Además, la portabilidad y los costos relativamente reducidos de Minlon ONT si lo comparamos con los enfoque relativos a secuenciación mediante shotgun, han hecho viable su implementación en una amplia variedad de entornos, desde laboratorios clínicos hasta estudios de campo. Este enfoque accesible abre nuevas posibilidades para explorar no solo la diversidad microbiana, sino también las rutas metabólicas a nivel predictivo mediante herramientas como la base de datos de MetaCyc y PICRUSt2. (Caspi et al., 2020a) (Douglas et al., 2020b) Estas rutas incluyen procesos clave como la producción de ácidos grasos de cadena corta y el metabolismo del nitrógeno, que juegan roles esenciales en la estabilidad del microbioma y su relación con el hospedero.

A pesar de las ventajas claras de las tecnologías de tercera generación, estas aún enfrentan desafíos técnicos significativos. Entre ellos se encuentran la necesidad de algoritmos bioinformáticos robustos para manejar los errores intrínsecos de las lecturas largas y la alta demanda computacional requerida para procesar datos complejos. Sin embargo, los avances recientes en la tecnología

de ONT han permitido mitigar algunas de estas limitaciones. Tal como lo exponen Zhan et al. (2023), la incorporación de la celda de flujo R10.4.1, en combinación con reactivos avanzados en base a la química Q20+ (el sistema puede generar lecturas con una precisión de base superior al 99%) y el kit SQK-LSK114, ha mejorado notablemente la precisión de las lecturas de ONT, alcanzando tasas de error promedio cercanas al 3%. Este avance representa una reducción significativa en comparación con la versión anterior R9.4.1, donde los errores podían alcanzar desde un 5 hasta un 7%.(T. Zhang et al., 2023)

Estas mejoras en la precisión de las lecturas, particularmente en la reducción de errores de inserción y deleción, han fortalecido la capacidad de ONT para generar datos más confiables a nivel de especie. Esto es especialmente relevante en el análisis del microbioma oral, donde la alta similitud entre especies estrechamente relacionadas plantea desafíos taxonómicos. Además, estas mejoras permiten una integración más efectiva con herramientas bioinformáticas como Emu y NanoCLUST, las cuales han sido optimizadas para trabajar con datos generados a partir de la celda de flujo R10.4.1.

En este contexto, la combinación de avances en hardware y optimizaciones bioinformáticas refuerzan el papel de ONT como una herramienta fundamental en los estudios del microbioma. Si bien estas innovaciones no eliminan completamente los desafíos asociados con la secuenciación de lecturas largas, han permitido que esta tecnología se acerque cada vez más a niveles de

precisión comparables a los de plataformas como PacBio, aunque con costos y tiempos de ejecución más accesibles. Esto hace de ONT una opción particularmente atractiva para aplicaciones clínicas y experimentales que requieren capacidad para generar datos a nivel de especie.

2.5. Relevancia de las vías metabólicas funcionales en el microbioma oral

Algunas vías metabólicas funcionales son esenciales en la homeostasis del microbioma oral y en su interrelación con la salud sistémica. Este ecosistema microbiano, más allá de su diversidad taxonómica, está definido por una red de interacciones metabólicas complejas que incluyen procesos como la fermentación de carbohidratos a ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), la producción de compuestos sulfurosos volátiles y la reducción de nitratos a nitritos, fundamentales para la síntesis de óxido nítrico (NO). (Miller et al., 2019) Estos metabolitos no solo regulan el pH y la inflamación local, sino que también tienen injerencia crítica en la función cardiovascular y el equilibrio inmunológico del hospedero. (Li et al., 2022)

Según Takahashi et al. (2015), los procesos sacarolíticos liderados por géneros como *Streptococcus* y *Lactobacillus* generan SCFAs como el acetato, propionato y butirato. Aunque esenciales para la regulación del pH, estos ácidos, en concentraciones elevadas, pueden contribuir a la desmineralización del esmalte y la progresión de la caries. En contraste, los procesos proteolíticos, típicos de especies como *Porphyromonas gingivalis*, producen compuestos como el sulfuro

de hidrógeno y el amoníaco, que favorecen un ambiente más alcalino y contrarrestan la acidificación local, aunque también pueden potenciar la inflamación en el tejido periodontal. (Takahashi, 2015) mientras tanto, la vía metabólica del nitrato-nitrito-óxido nítrico destaca por su importancia en la regulación cardiovascular y periodontal.(Li et al., 2022) Bacterias orales como *Actinomyces* spp. y *Veillonella* spp. son responsables de la reducción de nitratos a nitritos, los cuales actúan como precursores de NO. Este compuesto tiene efectos vasodilatadores y antiinflamatorios importantes. Alteraciones en esta vía, ya sea por disbiosis o el uso de antisépticos como la clorhexidina, han mostrado reducir la producción de NO, contribuyendo a condiciones proinflamatorias tanto locales como sistémicas. Rosier et al. (2022) documentaron cómo la alteración de esta vía metabólica está vinculada a una mayor incidencia de hipertensión arterial y disfunción endotelial.(Rosier et al., 2020) (Rosier et al., 2022)

Herramientas bioinformáticas como PICRUST2 y MetaCyc han revolucionado el entendimiento de estas rutas metabólicas al inferir funciones a partir de datos de secuenciación del *16S rRNA*.(Caspi et al., 2016a) Estas herramientas permiten predecir cómo las comunidades microbianas alteran rutas metabólicas críticas, como la fermentación de carbohidratos, la degradación de aminoácidos y la biosíntesis de lípidos. Este enfoque es particularmente relevante en enfermedades periodontales y en condiciones asociadas a la disbiosis oral, donde la formación de biopelículas y la virulencia de especies clave como

Fusobacterium nucleatum y *Treponema denticola* están directamente relacionadas con alteraciones metabólicas específicas.(Sedghi et al., 2021b)

2.6. Desafíos y estrategias en el manejo de la microbiota oral: perspectivas en el tratamiento de infecciones orales

La microbiota oral se constituye como un ecosistema complejo y dinámico, juega un papel fundamental en la salud bucodental.(J. Wang et al., 2022) No obstante, su desequilibrio puede conducir a patologías como la periodontitis apical. Los estudios morfológicos indican que las biopelículas bacterianas son comunes en infecciones endodónticas, lo que presenta un desafío significativo para el control de infecciones, sin distinguir claramente si son causa o consecuencia de la enfermedad.(Flemming & Wingender, 2010)

Las biopelículas varían en morfología y composición, lo que afecta su desarrollo y respuesta al tratamiento. Se ha reconocido que la interacción colectiva de comunidades microbianas, más que la presencia de un único patógeno, es determinante en la patogenicidad. Esta visión amplía la comprensión de la etiología de las enfermedades orales y la necesidad de considerar el consorcio microbiano en su totalidad al abordar el tratamiento.(Siqueira & Rôças, 2022)

La diversidad de la microbiota endodóntica refleja una etiología heterogénea en la periodontitis apical, donde diversas combinaciones de especies pueden desencadenar el mismo cuadro clínico. Esto resalta la relevancia de entender la patogenicidad comunitaria y la fisiología colectiva de las biopelículas, más allá de

la identificación individual de patógenos.(Siqueira & Rôças, 2022)(Siqueira & Rôças, 2013)

La salud bucal se ve comprometida no solo por factores microbianos, sino también por influencias externas como la dieta, hábitos del hospedero y respuestas inflamatorias. La disbiosis del microbioma bucal puede llevar a caries, enfermedades periodontales y, si no se tratan adecuadamente, a complicaciones más severas.(Hajishengallis, 2015)(Hajishengallis & Lamont, 2012) La gestión eficaz de la disbiosis, mediante la desinfección y tratamiento adecuados, es esencial para prevenir y controlar estas afecciones.

La enfermedad periodontal, en particular, surge de una disbiosis que altera la respuesta inmune del hospedero y fomenta una inflamación crónica. Especies clave, como las del complejo rojo (*T. forsythia*, *T.denticola* y *P.gingivalis*), son etiológicas en este proceso, reestructurando la microbiota y exacerbando la inflamación.(Hajishengallis & Lamont, 2012) La periodontitis, a diferencia de la gingivitis, conduce a un daño irreparable y la posible pérdida de dientes, enfatizando la importancia de intervenciones tempranas y eficaces en el manejo de la microbiota oral.(Sedghi et al., 2021a)

En la actualidad, el creciente interés por tratamientos implantológicos ha llevado a la búsqueda de alternativas efectivas en cuanto a actividad antimicrobiana y a biocompatibilidad al momento de tratar el principal motivo de fracaso que suele ocurrir denominada periimplantitis.(Darby, 2022)

2.7. Antisépticos bucales y su impacto en la microbiota oral

Los enjuagues bucales antimicrobianos, como la clorhexidina (CHX), han sido ampliamente utilizados debido a su capacidad para eliminar una variedad de patógenos orales, incluidos *S. aureus*, *C. albicans*, *S. mutans* y *P. gingivalis*. Sin embargo, investigaciones recientes han evidenciado que su uso prolongado puede alterar significativamente la composición de la microbiota oral, generando implicaciones tanto locales como sistémicas. Estudios como los de Chatzigiannidou et al. (2020) han mostrado que, si bien la CHX es efectiva para reducir temporalmente la viabilidad bacteriana en biopelículas orales (con una reducción inicial de hasta 3 log en la viabilidad bacteriana), esta disminución tiende a recuperarse en 24-72 horas. Además, se observaron cambios significativos en la composición microbiana, destacándose una selección diferencial de taxones, como *Streptococcus gordonii* en biopelículas sintéticas y *Fusobacterium* spp. en biopelículas humanas. Estos cambios no solo alteran la estructura comunitaria, sino que también inducen un impacto en el perfil metabólico de las biopelículas, evidenciándose una reducción inicial en la producción de propionato y acetato, seguida por un aumento en lactato, un metabolito asociado con condiciones cariogénicas.

De acuerdo con lo anterior, estos cambios en la microbiota oral están asociados con un descenso en el pH salival y la capacidad amortiguadora de la saliva, junto con un incremento en la concentración de lactato salival. Tales alteraciones crean un ambiente propicio para la proliferación de especies acidogénicas, que pueden

contribuir al desarrollo de caries y enfermedades periodontales. Además, la reducción en las concentraciones de nitrito oral y plasmático tiene un impacto directo en la vía nitrato-nitrito-óxido nítrico (NO), afectando negativamente la capacidad de regulación cardiovascular mediada por bacterias orales específicas.(Li et al., 2022)

Por su parte, Hyde et al. (2014a) evaluaron cómo el uso de CHX altera la disponibilidad de óxido nítrico (NO) al interrumpir la reducción de nitratos a nitritos, un proceso dependiente de las bacterias reductoras presentes en la lengua. En modelos animales, se observó que esta interrupción disminuye la producción de NO, lo cual está directamente relacionado con un aumento en la presión arterial. Este resultado destaca la importancia funcional de la microbiota oral en la salud cardiovascular, mostrando que la alteración de estas comunidades bacterianas puede impactar negativamente tanto la salud local como sistémica.

Además, este estudio caracterizó el microbioma oral de ratas Wistar utilizando secuenciación del gen *16S rRNA*, encontrando que la microbiota de la lengua de estas ratas es menos diversa que la de humanos, con diferencias clave en su composición. Mientras que en humanos se detectan géneros como *Veillonella* spp. y *Neisseria* spp. en abundancia significativa, en ratas predominan géneros como *Corynebacterium* spp. y *Micrococcaceae* spp. Sin embargo, se demostró que ambos microbiomas comparten la capacidad de reducir nitratos, subrayando

la conservación funcional de este proceso metabólico entre especies.(Hyde et al., 2014a)

El estudio antes mencionado también exploró los efectos del enjuague con CHX en la microbiota oral suplementada con nitrato.(Hyde et al., 2014b) Se observó un aumento en la diversidad microbiana en la lengua de las ratas tratadas con CHX, lo que implica una disrupción de la comunidad bacteriana original y la colonización de especies oportunistas. Notablemente, la abundancia relativa de *Haemophilus parainfluenzae*, una bacteria reductora de nitrato disminuyó significativamente tras el tratamiento con CHX, lo que podría explicar la reducción en la producción de NO y su relación con un control deficiente de la presión arterial.

Por otra parte, según Wand et al. (2017), la exposición a concentraciones subletales de clorhexidina (CHX) puede inducir resistencia cruzada a antibióticos de último recurso, como colistín, a través de mecanismos moleculares complejos. En un estudio con *Klebsiella pneumoniae*, se demostró que la adaptación a CHX no solo incrementa los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) para este antiséptico, sino que también promueve cambios genéticos y fenotípicos asociados con la resistencia cruzada a colistín. Entre los mecanismos identificados, destacan las mutaciones en los sistemas reguladores de dos componentes *phoPQ* y *smvR*. Estas mutaciones provocan una regulación ascendente de genes como *smvA* y *pmrK*, los cuales están implicados en la

modificación del lipopolisacárido (LPS) y en la actividad de bombas de eflujo, respectivamente. Además, la sobreexpresión de *smvA*, una bomba de eflujo de la familia de facilitadores mayores (MFS), refuerza la capacidad de las bacterias para expulsar no solo CHX, sino también otros antimicrobianos.

Por otro lado, Cieplik et al. (2019) destacan que las bombas de eflujo, como las codificadas por los genes *qacA/B* en bacterias Grampositivas, no solo contribuyen a la resistencia a CHX, sino que también están asociadas a resistencias cruzadas a múltiples antimicrobianos, incluidos aminoglucósidos y fluoroquinolonas. En bacterias Gramnegativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, se ha identificado que sistemas de eflujo como MexAB-OprM y MexCD-OprJ son inducidos por CHX, ampliando su espectro de resistencia. (Cieplik et al., 2019)

En el ámbito odontológico, el uso prolongado de CHX en productos de higiene oral y tratamientos periodontales plantea preocupaciones adicionales. Se ha observado que, bajo exposiciones subinhibitorias, CHX puede inducir la formación de subpoblaciones bacterianas tolerantes conocidas como células persistentes (Brauner et al., 2016), especialmente en biopelículas orales de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Estas células, aunque metabólicamente inactivas, pueden reactivarse tras la eliminación del agente antimicrobiano, perpetuando la resistencia y dificultando la erradicación de infecciones orales crónicas. Este fenómeno, se agrava cuando se considera que

CHX no solo afecta la microbiota oral, sino que también puede inducir resistencia cruzada a otros antimicrobianos utilizados en la práctica odontológica. Wigand et al. (2021) demostraron por medio de análisis bioinformáticos que el uso de CHX, junto con hipoclorito de sodio (NaOCl), puede seleccionar clones bacterianos que contienen genes previamente no asociados con resistencia, como *accB* y *recA* (Wigand et al., 2021). Estos genes, identificados mediante un enfoque metagenómico funcional, confieren resistencia al alterar procesos fundamentales como la biosíntesis de fosfolípidos y la reparación del ADN por recombinación homóloga, *accB*, que codifica la proteína acarreadora de biotina (BCCP) en la acetil-CoA carboxilasa, se asocia con una mayor tolerancia a CHX al reforzar la integridad de la membrana bacteriana estimulándose una mayor producción o biosíntesis de fosfolípidos de membrana.

Por otro lado, el gen *recA* desempeña un papel esencial en la recombinación homóloga y la respuesta SOS bacteriana, mecanismos que permiten la reparación del ADN dañado por agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio (NaOCl) (Collao et al., 2012). En el estudio de Wigand et al. (2021), se demostró que la introducción de *recA* en cepas de laboratorio de *E. coli* deficientes en este gen (*DH5α* y *BacRep*) incrementó significativamente la resistencia a NaOCl, aumentando la concentración mínima inhibitoria (MIC). Esto destaca cómo *recA* facilita la recuperación celular al reparar el daño genético causado por el NaOCl.

Toda este panorama enfatiza la necesidad de explorar alternativas terapéuticas que minimicen la presión selectiva en la microbiota oral. Algunas estrategias propuestas incluyen el uso de nanopartículas antimicrobianas, que ofrecen una eficacia superior con menor impacto en el equilibrio microbiano, y el desarrollo de combinaciones de agentes antimicrobianos que mitiguen la aparición de resistencia cruzada.

2.8. Nanopartículas de cobre en odontología

En el campo odontológico, las CuNPs encuentran una amplia gama de aplicaciones. Se pueden distribuir en la superficie de diversos materiales dentales o incorporarse en ellos para conferir propiedades antibacterianas y al mismo tiempo preservar las características mecánicas de los materiales. Estas CuNPs también muestran la capacidad de inhibir las metaloproteinasas (MMP) y pueden ser utilizadas en adhesivos, materiales restauradores, recubrimientos para implantes, brackets de ortodoncia, enjuagues bucales entre otros.(Ahrari et al., 2015)

De manera similar a como se ejemplifica en la **Figura 1**, estos nanomateriales actúan mediante varios mecanismos, incluida la muerte por contacto y la modificación de la expresión génica de los microorganismos. Además, han mostrado capacidad para interferir con la coagregación bacteriana y la formación de biopelículas, lo que reduce la patogenicidad y la acumulación de bacterias.(Shrestha & Kishen, 2016) (Ma et al., 2022)

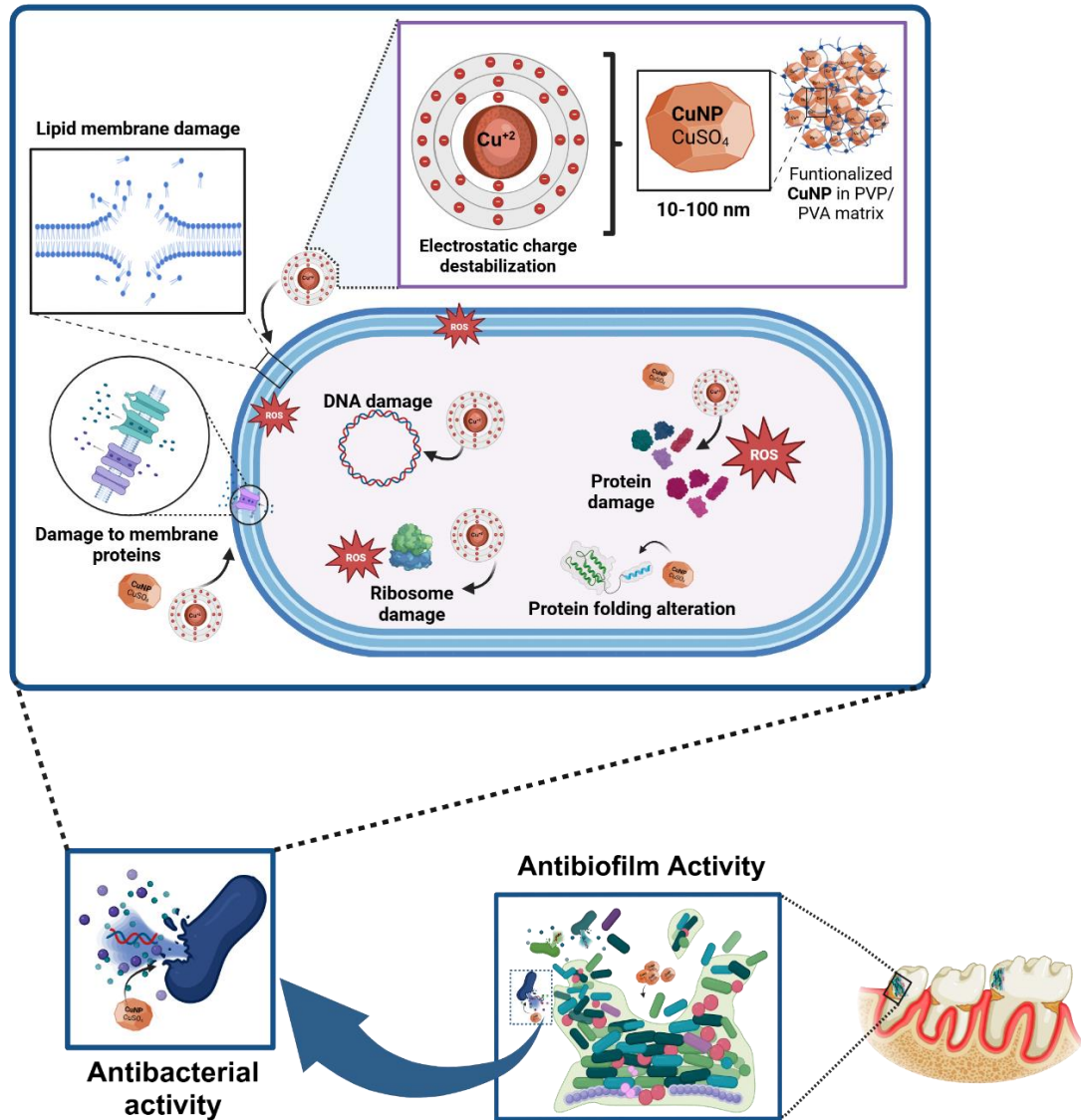


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de acción de nanopartículas de cobre (NPCu) funcionalizadas en matriz PVP/PVA sobre estructuras bacterianas. Las NPCu generan daño principalmente en el ADN, proteínas y ribosomas a través de especies reactivas de oxígeno (ROS). Imagen creada con BioRender.com y basada en la información de Capuano et al.(2023).

Actualmente, la investigación en tratamientos endodónticos ha dado un paso adelante con el desarrollo de geles nanoestructurados con CuNPs, sintetizados a través de un método eficiente asistido por microondas en un solo paso, que produce una estructura funcionalizada en una red polimérica.(Berrío et al., 2024a) Este avance apunta a mejorar la desinfección intraconducto, sino que también promueven la proliferación celular, mostrando un perfil prometedor tanto en biocompatibilidad como en propiedades antimicrobianas.(Samiei et al., 2016)(Shrestha & Kishen, 2014)(Wu et al., 2014)(Sacoto-Figueroa et al., 2021)

Dentro de nuestra línea de investigación, se ha avanzado en el desarrollo de nanogeles funcionalizados con nanopartículas de cobre (NPCu), utilizando un método asistido por microondas en un solo paso.(Berrío et al., 2024) Este enfoque permite la síntesis rápida y eficiente de nanogeles, combinando PVA (Polivinilalcohol) y PVP (Polivinilpirrolidona) como matrices poliméricas entrelazadas físicamente. Estas matrices no solo estabilizan las NPCu, sino que también contribuyen a la biocompatibilidad del material, eliminando la necesidad de agentes químicos adicionales que podrían comprometer su uso clínico. Según Berrío et al. (2024), los nanogeles de NPCu sintetizados bajo estas condiciones demostraron ser altamente efectivos contra *Enterococcus faecalis*, un patógeno asociado con infecciones endodónticas persistentes. Los ensayos mostraron que, tras 24 horas de exposición, se logró una actividad bactericida completa, superando significativamente a formulaciones basadas en nanopartículas de plata.

Además, los nanogeles fueron evaluados en modelos de biopelículas endodónticas maduras multiespecie. Los resultados revelaron una reducción significativa de la biomasa bacteriana tras una exposición de siete días, destacando la capacidad de las NPCu para penetrar las matrices de biopelículas y desestabilizar sus comunidades bacterianas. Esto se atribuye al mecanismo de acción multifactorial de las NPCu, que incluye la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la interacción directa con las membranas bacterianas, causando daño estructural y funcional. Comparativamente, los nanogeles de cobre mostraron menor citotoxicidad en células humanas del ligamento periodontal, en comparación con los basados en nanopartículas de plata, lo que refuerza su perfil de seguridad y eficacia.

Adicionalmente, se evaluaron propiedades fisicoquímicas críticas de los nanogeles, como estabilidad térmica, viscosidad y capacidad de liberación controlada de cobre iónico, que garantizan una acción prolongada sin comprometer las propiedades mecánicas del material.

En conjunto, estos avances no solo posicionan a los nanogeles de NPCu como una alternativa a los desinfectantes convencionales, sino que también destacan su capacidad para complementar tratamientos existentes y abordar infecciones crónicas asociadas a biopelículas resistentes. Sin embargo, para validar su uso clínico, se requiere continuar con estudios *in vivo* que aborden la interacción con

el ecosistema oral en condiciones reales y evalúen su desempeño a largo plazo en tejidos vivos.

Es entonces que adquiere relevancia comprender que estos nanogeles de NPCu no buscan reemplazar los desinfectantes tradicionales, sino ofrecer alternativas complementarias que potencien los tratamientos existentes, especialmente en casos de infecciones crónicas asociadas a biopelículas resistentes. Tal como hemos visto, su capacidad para combinar una alta eficacia antimicrobiana con un perfil favorable de biocompatibilidad los posiciona como una opción prometedora para mejorar los protocolos actuales de desinfección en endodoncia, pero también con la opción de ser utilizados en otros tratamientos odontológicos donde se requiera de un efecto antibacteriano que permita la reducción de la biomasa de microorganismos. Sin embargo, para garantizar su seguridad y efectividad en aplicaciones clínicas, se destaca la necesidad de realizar estudios *in vivo* que evalúen su desempeño en condiciones más cercanas a la realidad clínica, incluyendo su interacción con tejidos periapicales y el ecosistema oral en general. Esto permitirá validar su potencial como herramienta terapéutica innovadora en el manejo de infecciones odontológicas.

2.9. Efectos del entorno sobre propiedades de las nanopartículas de cobre

Las condiciones ambientales pueden tener un impacto significativo en las propiedades y el efecto antibacteriano de las CuNPs. La temperatura y el pH del

disolvente pueden afectar la velocidad a la que el cobre inhibe los microorganismos.

El estado de oxidación del cobre también desempeña un papel relevante en sus propiedades antimicrobianas. Las nanopartículas de cobre puro exhiben una mayor actividad antibacteriana que las nanopartículas de CuO debido a su mayor capacidad de aceptación de electrones y una mejor transferencia de electrones con las bacterias.(Hans et al., 2013)

La interacción de las CuNPs con el tejido hospedero también es un aspecto a considerar. Aunque se han observado efectos tóxicos en ciertos órganos como el hígado y los riñones, los estudios sugieren que las nanopartículas de cobre aplicadas en materiales dentales rara vez ingresan al cuerpo y, por lo tanto, pueden ser seguras en ese sentido.(Ma et al., 2022) Además, debido a su efectividad antimicrobiana, las CuNPs pueden tener un efecto inhibitor menor sobre los microorganismos patógenos orales en comparación con el cobre nativo. Esto los convierte en una opción prometedora para controlar la biopelícula y prevenir la caries dental.

A pesar de la toxicidad intrínseca de las CuNPs, la funcionalización emerge como una solución clave, mediante técnicas como la unión covalente y no covalente, y los procesos sol-gel, entre otros. Estos métodos favorecen la formación de complejos que pueden incorporarse en matrices poliméricas, como los 'surfmers'. El resultado son estructuras nanoestructuradas que permiten una liberación

controlada de agentes, disminuyendo así la toxicidad y mejorando la biocompatibilidad en aplicaciones.(Durán Almendárez, 2019)(Shrestha & Kishen, 2016)

2.10. Biomarcadores y medición de parámetros hematológicos como indicadores de toxicidad

2.10.1. Parámetros de salud nutricional: Peso corporal y consumo de alimentos

El seguimiento diario del peso corporal y la ingesta de alimentos en modelos animales es esencial para evaluar el bienestar y detectar precozmente signos de toxicidad o enfermedad. Conforme a los protocolos de Morton y Griffiths (1985), estas mediciones proporcionan una evaluación objetiva de la salud del animal. Variaciones en el peso inferiores al 5% se consideran normales, mientras que descensos más pronunciados sugieren estrés o efectos adversos, pudiendo indicar toxicidad cuando superan el 20%. (Morton & Griffiths, 1985)

2.10.2. Peso de Órganos internos

La medición de esta variable es crítica según lo estipulado por la directriz 407 de la OCDE, que especifica evaluación de toxicidad sistémica en roedores, incluyendo efectos endocrinos e inmunotóxicos. Esta directriz prioriza a la rata como animal modelo debido a la facilidad de su disección. El análisis del peso de órganos vitales como el hígado, riñones, bazo, cerebro y corazón es indispensable para identificar efectos tóxicos específicos. (Marxfeld et al., 2019)

2.10.3. Parámetros hematológicos

En el contexto de la toxicología, los estudios preclínicos de seguridad se han vuelto esenciales para la autorización de comercialización de nuevas sustancias y productos. Las ratas SD son habitualmente empleadas en estos estudios debido a su utilidad en la evaluación toxicológica.(Zierk et al., 2015)(Adeli et al., 2015) La hematología y la bioquímica clínica son indispensables para identificar cambios biológicos significativos que no son evidentes en la examinación directa de órganos y tejidos.(Alemán et al., 1998) Estos análisis proporcionan datos valiosos sobre el estado general de salud, incluyendo el diagnóstico de enfermedades sanguíneas, infecciosas, y la evaluación del sistema inmunitario, así como la función del metabolismo de las lipoproteínas, regulación de la glucosa, y la salud hepática y renal. Desviaciones de la homeostasis normal en estos parámetros pueden ser indicativas de alteraciones patológicas.(Honda et al., 2008)

2.10.4. Marcadores de toxicidad hepática: AST y ALT

Las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) tienen roles críticos en el metabolismo intermedio y en la gluconeogénesis hepática.(H. J. Kim et al., 2020)(Felig, 1973) La AST se localiza en diversos tejidos, incluyendo el hígado, corazón, músculos, riñones, cerebro y células sanguíneas, mientras que la ALT se presenta principalmente en el hígado, aunque también puede encontrarse en el plasma y otros órganos.(Daxboeck et al., 2005) La liberación aumentada de estas enzimas al torrente sanguíneo es

indicativa de daño hepatocelular, lo que puede ocurrir por la acción de sustancias tóxicas, infecciones virales o diversas patologías hepáticas.(Dufour et al., 2000) Usualmente, la actividad enzimática de la ALT en suero es más elevada que la de la AST en enfermedades hepáticas. En el ámbito clínico, se mide comúnmente la actividad de estas enzimas en suero mediante ensayos enzimáticos, en los cuales la reacción de transaminación se acopla a una reacción secundaria que convierte el piruvato en lactato por medio de la lactato deshidrogenasa.(H. J. Kim et al., 2020)(H. J. Kim et al., 2009)

2.10.5. Modelos animales en nanotoxicología y en investigación oral

La nanotoxicología explora cómo los nanomateriales afectan los sistemas biológicos, empleando una variedad de modelos de complejidad creciente, desde cultivos celulares hasta modelos animales, con el fin de aproximar la realidad del organismo humano.(Chrishtop et al., 2021) A pesar de que los cultivos celulares 3D y los organoides muestran un potencial considerable para simular interacciones celulares y genética humana, su traslación a la práctica clínica aún es incipiente.(Caplin et al., 2015) En tanto, los modelos animales se erigen como el “*gold standard*” en las pruebas de toxicidad, integrando diversas especies que, si bien proporcionan valiosa información, a menudo no profundizan en los efectos a largo plazo de la nanotoxicidad, lo que subraya la importancia de estudios más exhaustivos.(Caplin et al., 2015)(B. Zhang et al., 2018)

Los estudios con modelos animales han sido ampliamente utilizados en la odontología, proporcionando lineamientos sobre la caries dental, la inmunología de la cavidad oral y la patogénesis de la enfermedad periodontal.(Hajishengallis, 2023)(Fröhlich, 2018).

De acuerdo a lo anterior, los modelos de ratas Sprague Dawley han demostrado ser herramientas valiosas en la investigación del microbioma oral debido a su versatilidad y capacidad para simular cambios microbianos asociados a enfermedades comunes como caries y periodontitis. Estas ratas se han utilizado ampliamente para evaluar la relación entre la microbiota oral, la dinámica inmunitaria del hospedero y las respuestas a intervenciones terapéuticas. Por ejemplo, se han implementado en estudios que indagan sobre la inducción de caries dental mediante modelos nutricionales o microbianos, destacando su capacidad para replicar cambios patológicos específicos y proporcionar información clave sobre la interacción microbio-hospedero en un entorno controlado.

En términos de microbiota, los modelos Sprague-Dawley reflejan ciertas características de las comunidades bacterianas humanas, pero con una composición notablemente más simple. Mientras que la microbiota oral humana incluye filos dominantes como *Fusobacteria*, *Actinobacteria* y *Spirochaetes*, en las ratas Sprague Dawley predomina una mayor proporción de *Firmicutes* y *Proteobacteria*, especialmente de la clase *Gammaproteobacteria*. Estas

diferencias taxonómicas sugieren limitaciones importantes para la extrapolación directa de los resultados al contexto humano. Sin embargo, también proporcionan una oportunidad única para evaluar la estabilidad ecológica y las alteraciones inducidas por factores como la dieta, el estrés y las intervenciones antimicrobianas.

Un aspecto crítico en el diseño experimental con estos modelos radica en la influencia de factores externos. Como señala Gopinath et al. (Gopinath et al., 2024), variables como la dieta, la genética de los animales y las condiciones de alojamiento impactan significativamente en la diversidad y composición del microbioma oral. Por ejemplo, dietas ricas en fibra pueden promover una mayor diversidad bacteriana, mientras que aquellas altas en grasas y azúcares tienden a favorecer la proliferación de microorganismos patógenos. Esto refuerza la importancia de controlar rigurosamente las condiciones experimentales para minimizar la variabilidad y garantizar la reproducibilidad de los estudios.

Además, los modelos Sprague-Dawley han sido útiles para explorar cómo intervenciones específicas, como el uso de antibióticos o nanopartículas antimicrobianas, afectan las comunidades microbianas.

Estudios más recientes han podido evaluar y analizar los cambios producidos por ciertos antibióticos como espiramicina, amoxicilina y metronidazol inducen cambios significativos en la microbiota oral de ratas SD de tal manera que se ve aumentada la diversidad bacteriana, lo cual se podría atribuir a la posible

generación de comunidades bacterianas resistentes. Anteriormente, se ha evaluado este fenómeno determinándose que el aumento de la diversidad de la microbiota oral resulta desfavorable para el hospedero, viéndose afectadas también la ecología y las vías funcionales de las comunidades microbianas.(Cheng et al., 2022a)(Dudek-Wicher et al., 2018a)(Freire et al., 2021).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Frente a la administración tópica diaria de un gel antiséptico de nanopartículas de cobre (CuNPs) y de un gel de clorhexidina (CHX) sobre la mucosa oral de ratas Sprague-Dawley (SD) durante periodos de exposición de 7 y 30 días, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

1) ¿Cuál es el impacto en la composición, estructura y análisis funcional predictivo de vías metabólicas de la microbiota oral en las ratas tratadas diariamente con el gel de CuNPs y de CHX?

2) ¿Qué efectos tóxicos se manifiestan a nivel sistémico en las ratas expuestas al gel de CuNPs en comparación con el grupo tratado con un gel de CHX?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

4.1.1. Hipótesis 1 (Microbiota Oral)

La aplicación diaria de un antiséptico en gel con CuNPs modifica la composición, estructura y las vías funcionales de la microbiota oral en ratas, generando una disminución en la diversidad beta y en la abundancia relativa de especies bacterianas, que difiere en comparación con las ratas tratadas con CHX.

4.1.2. Hipótesis 2 (Efectos Sistémicos y Toxicidad)

La exposición de la mucosa oral de ratas Sprague-Dawley a la aplicación diaria con un gel de CuNPs no inducirá toxicidad sistémica determinada por parámetros medidos a nivel sistémico.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de la aplicación tópica diaria de un gel de CuNPs en la composición, estructura y análisis funcional predictivo de vías metabólicas de la microbiota oral y su efecto a nivel de toxicidad sistémica de ratas Sprague-Dawley.

4.2.2. Objetivos específicos

1. Comparar el impacto en la composición, estructura y vías funcionales predictivas de la microbiota oral normal de ratas SD, tratadas con un gel de CuNPs y con un gel de CHX, como tratamientos antisépticos de la mucosa oral para determinar qué tratamiento conlleva una alteración más beneficiosa y menos disruptiva para el desenvolvimiento de la microbiota oral en condiciones de salud de acuerdo con el tiempo de exposición.

2. Evaluar parámetros de salud nutricional, peso de órganos internos, perfiles hematológicos, incluyendo la serie roja y blanca y el biomarcador de toxicidad hepática ALT en ratas SD tras la aplicación diaria de un gel de CuNPs por 7 y 30 días, para detectar alteraciones indicativas de respuestas sistémicas adversas, comparando estos niveles con los observados en ratas tratadas con CHX.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Gel de nanoestructurado a base de nanopartículas de Cobre

Se utilizó un gel de nanopartículas de cobre (CuNPs), sintetizado por el Departamento de Ingeniería de Materiales de la Universidad de Concepción utilizando una solución de CuSO_4 (1,0 mM) en polietilenglicol como precursor metálico mezclando Polivinilpirrolidona (PVP) y Polivinilalcohol (PVA) en una relación molar de PVP: PVA de 1.0:1.0 (1.0-Cu/1P-gel) para funcionalizar las nanopartículas. Para sintetizarlo, la mezcla se agitó lentamente durante 4 h mediante un agitador magnético y se sometió a calentamiento asistido por microondas durante 20 min a máxima potencia (800 W). El gel se vertió en un molde y se gelificó a temperatura ambiente durante 2 h. Las características del gel se observan en la **Figura 2**. El gel nanoestructurado se congeló a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior uso. El tamaño de partícula de Cu al interior del gel es de $10.21 \pm 3.76\text{ nm}$ (**Fig. 3**).

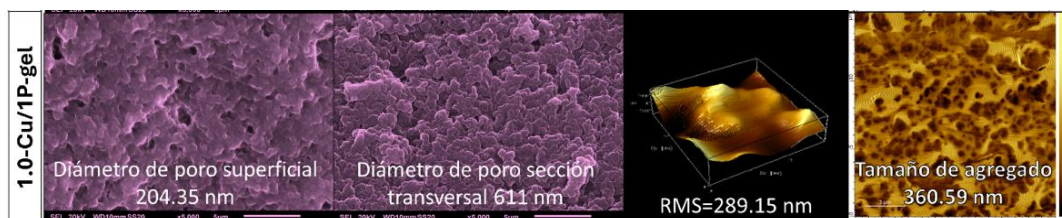


Figura 2. Micrográficas SEM e imágenes AFM para Cu/1P-gel. Micrográficas SEM de la superficie y sección transversal, reconstrucción AFM 3D e imagen de fase original $3 \times 3\text{ }\mu\text{m}$ 1.0-Cu/1P-gel con contenido de 1.0 PVA. (Fuente: Berrío ME et al.,2024)

1.0-Cu/1P-gel

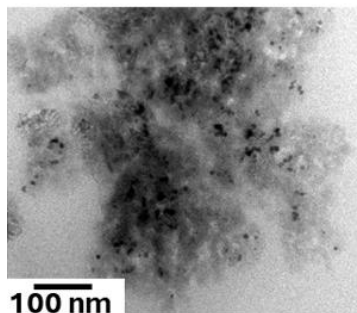


Figura 3. Análisis por Microscopía Electrónica de transmisión (TEM) para para 1.0-Cu/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.(Berrio et al., 2024a)

Gel de Clorhexidina: Clorhexidina al 2%, Endoart (Incidental, Türkiye), distribución comercial en formato jeringa de 2ml.

5.2. Metodología

En este trabajo, se llevaron a cabo una serie de procedimientos experimentales que abarcan desde la preparación de los materiales utilizados, la selección y manejo de los especímenes experimentales, la recolección de muestras biológicas, hasta los análisis bioinformáticos y estadísticos.

La **Figura 4** presenta un esquema general que resume las principales metodologías implementadas, facilitando una visión integrada de las etapas realizadas. Este esquema incluye los pasos más relevantes desde la selección de los animales y los tratamientos aplicados, la extracción y amplificación del ADN, los análisis hematológicos y bioquímicos, hasta los procedimientos de secuenciación y la detección de nanopartículas de cobre mediante TEM.

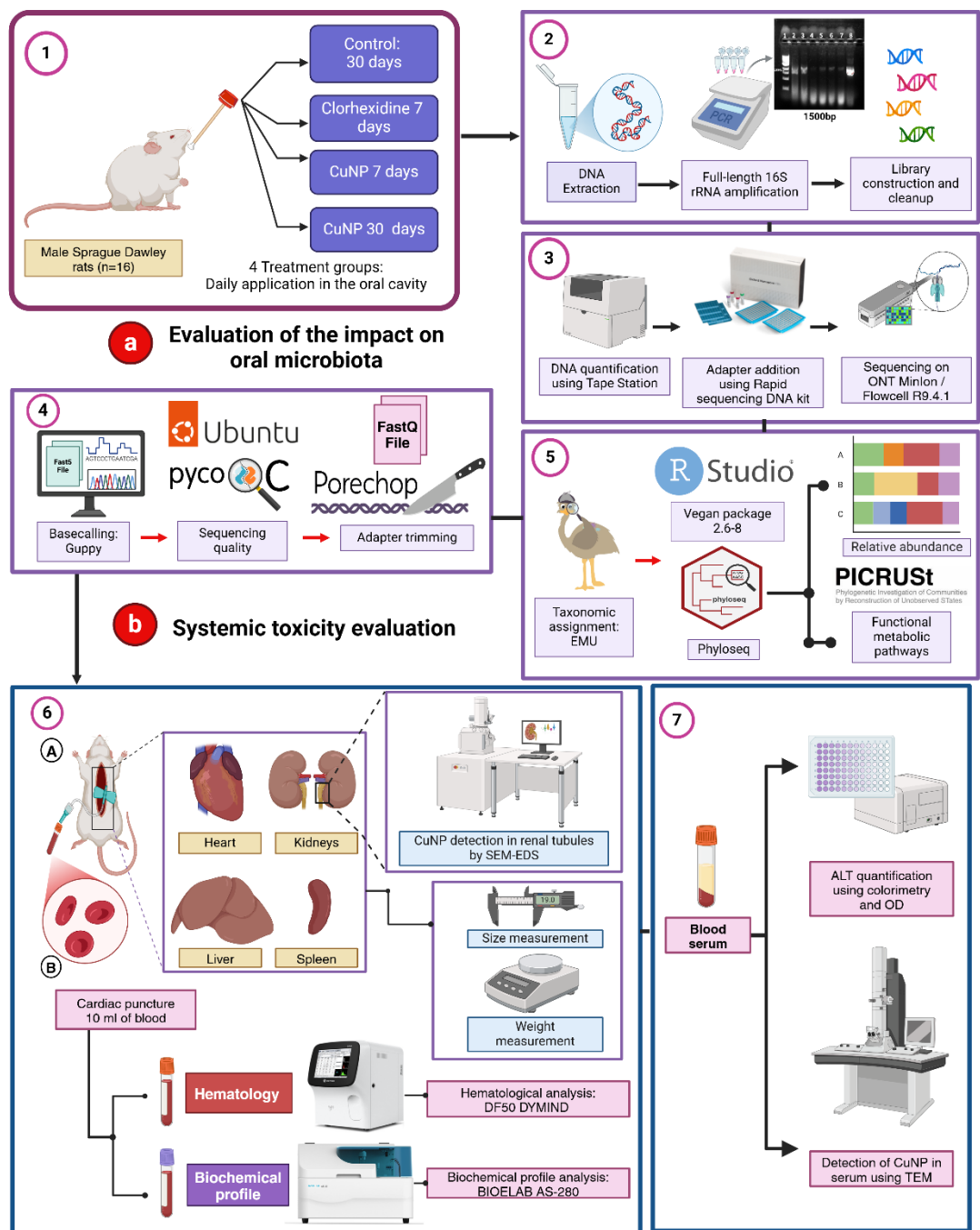


Figura 4. Esquema general de las metodologías empleadas en este estudio. Fuente: Elaboración propia creada con BioRender.

5.2.1. Selección de los animales de laboratorio

Se seleccionaron de forma aleatoria a 16 ratas macho Sprague-Dawley, de entre 6 y 8 semanas de edad y con un peso aproximado de 380 a 550 gramos. Estas se dividieron en 4 grupos de 4 individuos cada uno, y se alojaron en jaulas especializadas suministradas por el Centro Regional de Estudios Avanzados para la Vida (CREAV). Las condiciones de mantenimiento fueron las siguientes: una temperatura de 21 a 23 °C, humedad relativa del 60% y enriquecimiento ambiental a base de papel Kraft y mazorca de maíz como lecho. Además, se concedió libre acceso a agua autoclavada y se limpiaron las jaulas dos veces por semana. Las ratas estuvieron sujetas a un ciclo de luz/oscuridad de 12 Hrs y se mantuvieron en condiciones de ventilación de 15 a 20 cambios de aire por hora.

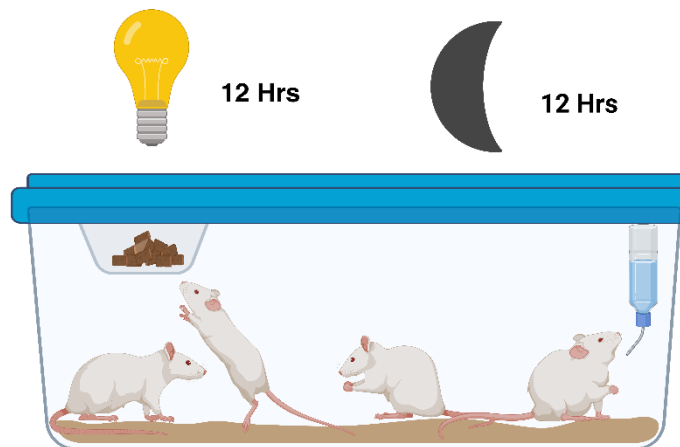


Figura 5. Distribución de ratas por jaula n = 4 individuos. Ciclos de luz oscuridad de 12 horas diarias. Fuente: Elaboración propia creada con BioRender.

5.2.2. Dieta estándar de los animales experimentales

Todas las ratas fueron alimentadas con la dieta estándar Prolab® Laboratory Rodent Diet RMH 3000 5P00 (LabDiet®), formulada específicamente para entregar una nutrición constante (Constant Nutrition®).

La dieta se compone de una combinación de proteínas animales y vegetales (22,5% de proteína cruda), grasas (5.1%), carbohidratos, y una mezcla de vitaminas y minerales esenciales (**Tabla 1**).

Tabla 1. Composición mineral de la dieta estándar Prolab® Laboratory Rodent Diet RMH 3000 5P00 (LabDiet®), indicando la concentración de macrominerales (expresados en %) y microminerales traza (expresados en ppm). Fuente: Elaboración propia.

Mineral	Concentración (ppm o %)	Mineral	Concentración (ppm o %)
Calcio (%)	1.09	Hierro ppm	360
Fósforo (%)	1.09	Zinc ppm	110
Fósforo (no fitato) (%)	0.47	Manganeso	100
Potasio (%)	0.95	Cobre ppm	14
Magnesio (%)	0.23	Cobalto ppm	0.41
Sulfuro (%)	0.29	Yodo ppm	0.99
Sodio (%)	0.22	Cromo ppm (adicionado)	0.01
Cloruro (%)	0.40	Selenio ppm	0.41

5.2.3. Parámetros medidos y monitoreados diariamente

Todos los especímenes fueron sometidos a la medición y registro de sus pesos corporales, el consumo diario de alimento por jaula (n=4) en gramos, y aspecto en base al estado del pelaje, cambios de comportamiento espontáneos, cambios en el comportamiento de respuesta a la manipulación y constantes vitales de temperatura y frecuencia cardiaca. Así mismo se adaptó una pauta de supervisión diaria en base a protocolos de supervisión para murinos adaptados de las recomendaciones de Morton et al, 2000.

5.2.4. Grupos por tratamiento y protocolos de desinfección oral

Para cada uno de los siguientes grupos se emplearon hisopos de algodón estériles para aplicar la solución en la cavidad oral. Tras el séptimo o trigésimo día según el tratamiento descrito por grupo, se recopilaron muestras por hisopado oral para la secuenciación de la microbiota oral. Para esto último, se consideró el ayuno nocturno de todas las ratas tomando en cuenta que restos de alimentos en la cavidad oral podrían interferir con la recolección de las muestras. Adicionalmente se consideró la utilización de anestesia inhalatoria para evitar el estrés de cada individuo durante los procedimientos de hisopado (**Fig.5**).

Finalmente, se procedió a la eutanasia de los animales mediante sobredosis anestésica y punción cardiaca. Así mismo cada una de las ratas fueron diseccionadas para la correspondiente extracción de órganos incluyendo

corazón, bazo, hígado y riñones. Dichos órganos fueron pesados, medidos y fotografiados para analizar la existencia de posibles diferencias de acuerdo con el tratamiento recibido.

Grupo experimental nº1 (n=4) (Nomenclatura grupo: NG7d)

Este grupo recibió un tratamiento diario durante 7 días mediante aplicación tópica de aproximadamente 50 µL de un gel de nanopartículas de cobre (1.0-Cu/1P-gel), utilizando un hisopo de algodón estéril impregnado en gel, distribuido cuidadosamente sobre la mucosa oral (lengua paladar y encía vestibular) bajo anestesia inhalatoria con isoflurano al 5% en cámara de inducción, para minimizar el estrés y asegurar la correcta aplicación. La formulación contenía CuSO₄ en una matriz de PVP y PVA en relación molar 1.0:1.0.

Grupo experimental nº2 (n=4) (Nomenclatura grupo: NG30d)

Este grupo recibió el mismo tratamiento descrito anteriormente, pero prolongado durante 30 días.

Grupo sin antiseptizar (n=4) (Nomenclatura grupo: CONTROL)

Este grupo no recibió ningún tratamiento de antisepsia oral y se consideró para establecer un “baseline” de condiciones de normalidad tanto para los parámetros sanguíneos como para el microbioma central y con el que se comparó a los demás grupos.

Grupo asepticado con Clorhexidina(n=4) (Nomenclatura grupo: CHX7d)

Se trató a este grupo con aproximadamente 50 μ L clorhexidina en gel al 2% de la marca Endoart, con una aplicación diaria durante 7 días.

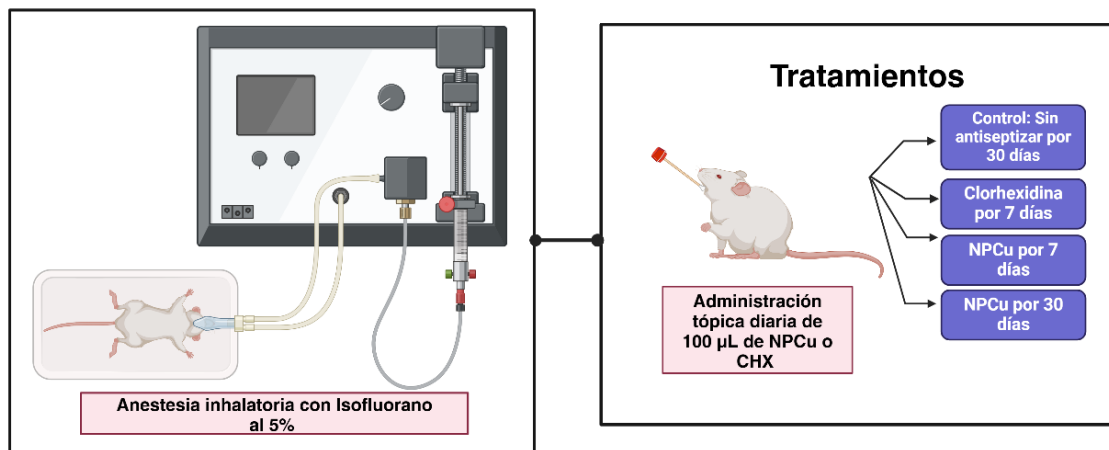


Figura 6. Procedimiento para la aplicación de tratamientos según grupo. Fuente: Elaboración propia creada con BioRender.

5.2.5. Determinación de la Dosis Administrada

Considerando que el gel posee una densidad de 1.1 g/mL, se calculó que la masa total aplicada por dosis es de 55 mg, ya que 50 μ L multiplicados por 1.1 g/mL equivalen a dicha cantidad. No obstante, el gel está compuesto tanto por la matriz polimérica (PVA y PVP) como por las nanopartículas de cobre, y se estima que el contenido activo en nanopartículas representa entre el 1.5% y el 2.5% en peso de la masa total. Así, la masa activa de CuNP presente en cada dosis se determinó de la siguiente manera: para un contenido del 1.5%, se obtiene 55 mg \times 0.015, lo que resulta en 0.825 mg; para un contenido del 2.0% se obtiene 55 mg

× 0.02, es decir, 1.1 mg; y para un contenido del 2.5% se llega a 55 mg × 0.025, equivalente a 1.375 mg.

Con el objetivo de estimar el número de nanopartículas presentes en la masa activa, se realizaron cálculos basados en el tamaño promedio de las CuNP, que fue de 10.21 nm (con una dispersión de ±3.76 nm). Asumiendo que las partículas son esféricas, se calculó el radio dividiendo el diámetro promedio entre dos, obteniéndose aproximadamente 5.105 nm. Recordando que 1 nm equivale a 1×10^{-7} cm, el radio se expresa como 5.105×10^{-7} cm. Utilizando la fórmula del volumen de una esfera, $V = (4/3)\pi r^3$, se obtuvo un volumen de 5.576×10^{-19} cm³ por nanopartícula.

Para determinar la masa de una sola nanopartícula, se utilizó el valor aproximado de la densidad de las nanopartículas de sulfato de cobre, que es de 3.06 g/cm³. Multiplicando la densidad por el volumen de una partícula se obtuvo una masa de 1.706×10^{-18} g por nanopartícula. Posteriormente, el número total de nanopartículas se estimó dividiendo la masa activa (convertida a gramos) por la masa de una sola nanopartícula. Para el escenario en que el contenido activo es del 1.5% (0.825 mg o 0.825×10^{-3} g), el número de nanopartículas resultó ser aproximadamente 4.83×10^{14} . En el caso de un contenido activo del 2.0% (1.1 mg o 1.1×10^{-3} g), se estimó un total de aproximadamente 6.44×10^{14} nanopartículas, y para el 2.5% (1.375 mg o 1.375×10^{-3} g) se obtuvo alrededor de 8.06×10^{14} nanopartículas.

La síntesis asistida por microondas y la formación *in situ* de las CuNPs dentro de la matriz polimérica aseguran una incorporación casi completa de las nanopartículas, evitando la formación de agregados y garantizando una buena dispersión en el gel. Es importante señalar que, a pesar de que la masa total administrada es de 55 mg, solo una pequeña fracción de este valor (entre 0.825 y 1.375 mg) corresponde al material activo en forma de nanopartículas. Este ajuste resulta fundamental para correlacionar las dosis administradas con la toxicidad observada, en especial cuando se compara con los valores de LD₅₀ reportados en estudios previos para CuSO₄ (100 mg/kg) y para CuONPs (400 mg/kg). (Kadammatil et al., 2018) Además, se alinea con los estándares internacionales descritos en la Sección 4 “Health Effects” del Test Guideline No. 425 de la OECD para Toxicidad Oral Aguda mediante el procedimiento Up-and-Down. (OECD, 2022)

5.2.6. Recolección de muestras de la cavidad oral

Se tomaron muestras orales de las ratas mediante hisopado, accediendo a la cavidad bucal con hisopos de algodón estériles. Se frotaron durante 30 segundos las zonas de una hemiarcada, incluyendo lengua, cara interna de la mejilla, encía marginal y papilar (molares e incisivos inferiores), y el paladar. Los hisopos se depositaron en tubos Eppendorf estériles con 150 µl de buffer TE, cortando el mango para conservar solo la parte en contacto con la cavidad oral (**Fig. 7**). Como control negativo ambiental, se utilizó un hisopo estéril que fue expuesto al aire sin contacto con animales y depositado en un tubo Eppendorf con 150 µl de buffer

TE, siguiendo las mismas condiciones. Bajo el mismo protocolo, se recolectaron muestras de la hemiarcada contraria, esta vez depositando los hisopos en tubos Eppendorf con 150 μ l de etanol al 96%. También se incluyó un control negativo ambiental paralelo bajo estas condiciones. Todas las muestras fueron colocadas inmediatamente en hielo seco, transportadas en un contenedor térmico a 4 °C hasta el laboratorio INCAR del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción y almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento.

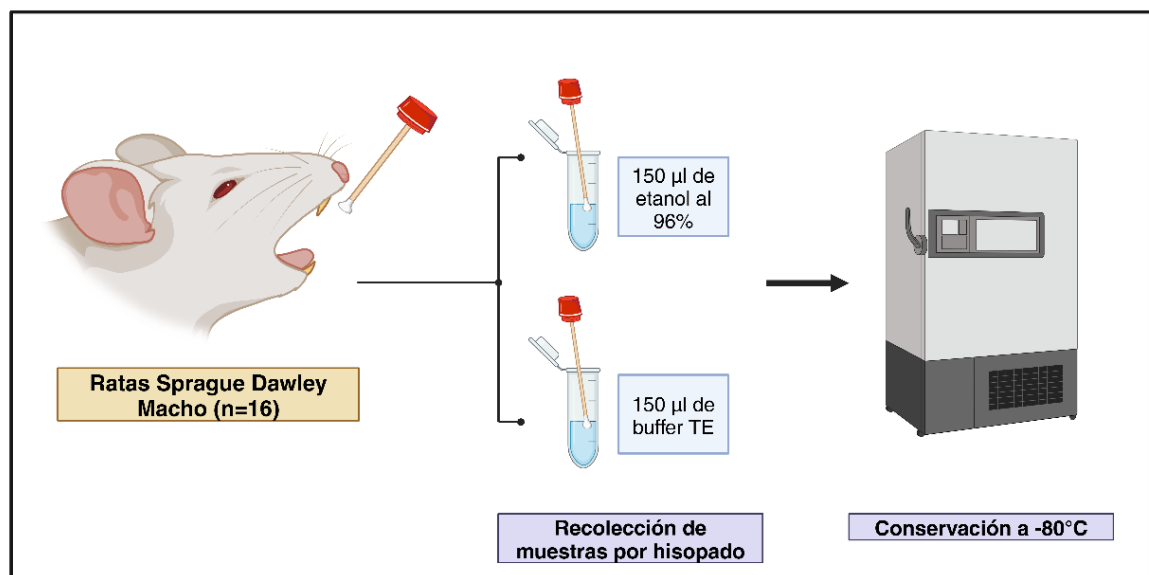


Figura 7. Recolección de muestras y almacenamiento a -80°C. Fuente: Elaboración propia creada con BioRender.

5.2.7. Eutanasias, punto final humanitario y recolección de sangre

Para las eutanasias de los grupos de investigación, se realizó una punción cardíaca para extraer aproximadamente 10 ml de sangre por rata, con el fin de realizar análisis hematológicos y bioquímicos (**Tabla 2**). Se emplearon agujas

hipodérmicas de calibre 21G para la extracción y se recolectó la sangre en tubos etiquetados y diferenciados de la siguiente manera: tubos con tapa lila de 3 ml, con anticoagulante EDTA K2 para el perfil bioquímico y tubos con tapa roja de 3,5 ml con activador del coágulo para hematología de serie roja y blanca (**Fig. 8 A**).

Las consideraciones que se tuvieron presentes para proceder con el punto final humanitario fueron inapetencia, diarrea o deshidratación por más de 48 h, en cuyo caso el animal debía ser sacrificado.

Una pérdida de peso del 20 % o más se tuvo en cuenta para ser notificada tanto al investigador principal como al responsable de bienestar animal y al veterinario; una pérdida del 25 % habría justificado el sacrificio del animal.

5.2.8. Analitos sanguíneos

A partir de las muestras de sangre recolectadas de cada individuo, se obtuvieron los datos hematológicos y bioquímicos. Los análisis de sangre, que incluyeron hemogramas y perfiles bioquímicos de cada espécimen, fueron realizados en el laboratorio clínico veterinario DIAGNOVET utilizando el equipo DF50 DYMIND para el análisis hematológico y el analizador bioquímico automatizado BIOELAB AS-280. Además, se solicitó al laboratorio la devolución de los sueros sanguíneos de cada rata, los cuales se transfirieron a tubos Eppendorf sellados con Parafilm y se almacenaron a -80 °C en los congeladores del cepario del Laboratorio de Investigación en Agentes Antimicrobianos de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Tabla 2. Resumen de los parámetros hematológicos, incluyendo analitos de la serie roja y serie blanca, junto con los parámetros bioquímicos analizados en las muestras. Fuente: Elaboración propia

Hematología: Serie Roja		Hematología: Serie Blanca	Bioquímica	Bioquímica
Eritrocitos	1000/ul	Leucocitos	Urea mg/dl	Bilirrubina total mg/dl
Hemoglobina	g/dl	1000/mm ³		colesterol mg/dl
Hematocrito	%	Neutrófilos	Creatinina mg/dl	glucosa mg/dl
VCM	fL	Linfocitos	fosforo mg/dl	albumina g/dl
HCM	pg	Monocitos	calcio mg/dl	pt total g/dl
CHCM	g/dL	Eosinófilos	Fosf. alc u/i	globulina g/dl
RDW-CV	%	Baciliformes	ggt u/i	
Plaquetas	1000/ul	Basófilos	ast u/i	
			alt u/i	

Estos sueros fueron preservados hasta la realización del ensayo colorimétrico para la detección y cuantificación de analitos marcadores de toxicidad, específicamente la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT).

Adicionalmente, se realizó la disección de los cadáveres para la extracción de los siguientes órganos: hígado, bazo, corazón y riñones (**Fig. 8 B**).

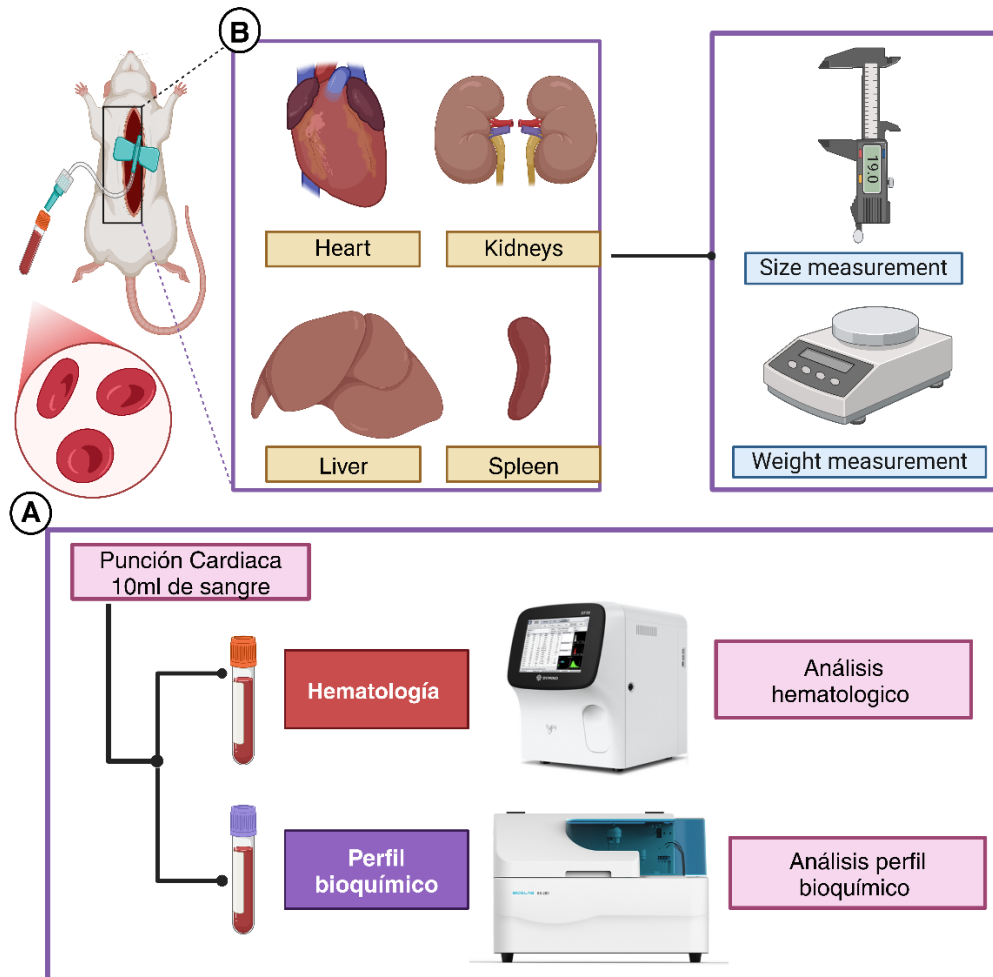


Figura 8. Procedimientos de eutanasias y disección. A) Obtención de sangre mediante punción cardíaca (10 mL) para análisis hematológicos y bioquímicos. B) Extracción y procesamiento de órganos (hígado, riñones, bazo y corazón), incluyendo medición de peso y tamaño para comparar entre grupos experimentales y controles. Fuente: Elaboración propia creada con BioRender.

Estos órganos fueron pesados, medidos y fotografiados con el objetivo de establecer comparaciones entre los grupos experimentales, controles negativos y positivos (**Fig. 8 B**). Posteriormente, se fijaron en una solución de formaldehído tamponado al 10%, y se almacenaron en frascos de polipropileno transparente

con tapa rosca antiderrame para su posterior traslado hasta las dependencias del laboratorio de histopatología de la Facultad de Odontología donde fueron almacenados a 4°C.

5.2.9. Medición de la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa (ALT)

La actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) se cuantificó en los sueros sanguíneos de las ratas utilizando un ensayo colorimétrico basado en el kit de ensayo de actividad ALT (MAK052, Sigma-Aldrich). Este protocolo permite determinar la actividad enzimática mediante la conversión de alanina a piruvato, catalizada por la ALT, seguida de la oxidación del NADH a NAD⁺, la cual es proporcional a la actividad de ALT. Las mediciones de absorbancia se realizaron a 570 nm empleando un lector de placas (Epoch, BioTek).

Preparación de reactivos y muestras

Los sueros sanguíneos, previamente almacenados a -80 °C, se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 6,000 rpm para eliminar posibles residuos celulares. Se utilizaron placas de 96 pocillos y micropipetas calibradas para garantizar precisión en la preparación de muestras y estándares. Los reactivos del kit se reconstituyeron según las indicaciones del fabricante.

Preparación de estándares y reacción de ensayo

Se prepararon estándares de piruvato en concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol/pocillo, utilizando diluciones seriadas en buffer de ensayo ALT. Las muestras de suero (20 μ L) se añadieron directamente a los pocillos en duplicado, ajustando el volumen con buffer de ensayo ALT. Para el control positivo, se agregaron 5 μ L del reactivo de control y se ajustó el volumen a 20 μ L con buffer de ensayo.

El ensayo se inició añadiendo 100 μ L de la mezcla maestra de reacción (86 μ L de buffer ALT, 2 μ L de sustrato de peroxidasa, 2 μ L de mezcla enzimática ALT y 10 μ L de sustrato ALT) a cada pocillo. Posteriormente, se mezclaron las soluciones mediante un agitador horizontal.

Condiciones de incubación y lectura

Las placas se incubaron a 37 °C, protegidas de la luz, y se realizaron mediciones de absorbancia a 570 nm al inicio (T0) y cada 5 minutos hasta alcanzar la fase lineal de la reacción. La medición final se estableció en el momento anterior a que las muestras más activas excedieran el rango lineal del estándar.

Cálculo la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa (ALT)

La actividad enzimática de ALT se calculó con base en el cambio de absorbancia (ΔA_{570}) entre los tiempos inicial y final, interpolando los valores en la curva estándar generada a partir de las concentraciones de piruvato conocidas. Los resultados se expresaron en unidades de actividad (mU/mL), donde una unidad

se define como la cantidad de enzima que genera 1 nmol de piruvato por minuto a 37 °C.

5.2.10. Extracción de ADN y amplificación del gen 16S rRNA

El ADN de las 16 muestras de microbiota oral fue aislado empleando el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen), siguiendo un protocolo adaptado para maximizar la calidad y pureza del material genético. Para comenzar, se retiró cuidadosamente la porción de algodón de cada hisopo, permitiendo que se secase durante una hora para facilitar la evaporación completa del etanol residual. Los restos de algodón secos se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 2 mL junto con 1 mL de Buffer InhibitEX y perlas de cerámica, y se sometieron a agitación en un molino mezclador Retsch MM200 a 24 Hz durante 10 min para lograr una disrupción mecánica homogénea.

A continuación, las muestras fueron sometidas a lisis térmica mediante incubación a 95 °C durante 15 min, optimizando la liberación de ADN de las células bacterianas. Posteriormente, se homogeneizaron nuevamente a 24 Hz durante 10 min y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 2 min a 20 °C para eliminar los residuos insolubles. El sobrenadante obtenido fue transferido cuidadosamente a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL que contenían 30 µL de proteinasa K, y se mezcló con 400 µL de Buffer AL para promover la digestión enzimática de proteínas y mejorar la recuperación de ADN. Las muestras se incubaron en una termoplaca a 94 °C durante 15 min para completar la lisis química.

Luego, se añadieron 400 μ L de etanol al 96% al lisado, y 600 μ L de esta mezcla se transfirieron a las columnas de centrifugación QIAamp. Estas columnas, diseñadas con membranas de alta afinidad para ADN, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min, descartando el filtrado. Este paso se repitió dos veces para asegurar que todo el ADN presente en el lisado se adsorbiera completamente a la membrana. Las columnas se lavaron de forma secuencial con 500 μ L de Buffer AW1 y Buffer AW2, centrifugándose a 13,000 rpm durante 1 y 3 min respectivamente, para eliminar contaminantes residuales. Un paso adicional de centrifugación a máxima velocidad durante 2 minutos garantizó la completa eliminación de residuos líquidos.

Finalmente, las columnas se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL limpios, y se aplicaron 40 μ L de Buffer TAE directamente sobre la membrana. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugaron a máxima velocidad durante 2 min para eluir el ADN. Este método permitió obtener ADN de alta calidad, adecuado para análisis posteriores de amplificación y secuenciación.

5.2.11. Amplificación por PCR del gen 16S rRNA full

La amplificación completa del gen 16S rRNA se efectuó con los cebadores 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Sun et al., 2008). Para el mix de PCR se añadieron 0.8 μ L del cebador 27F forward y 0.8 μ L del 1494R reverse. Se utilizó ADN polimerasa Taq LongAmp

(New England Biolabs, EE. UU.) en un volumen de 0.5 μL por reacción, con un volumen final de reacción de 20 μL , compuesto además por 2.4 μL de agua libre de nucleasas, 10 μL del mix comercial de reacción 2X LongAmp, y 6 μL de ADN de muestra. Se establecieron las siguientes condiciones térmicas: una inicial de 95 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos a 95 °C durante 20s, 56 °C por 30s, y 65 °C por 1 min, finalizando con una extensión de 65 °C por 5 min. La eficiencia de PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (EtBr), visualizado bajo luz ultravioleta (UV) en un transiluminador. Adicionalmente, la cuantificación y evaluación de la pureza del ADN extraído se realizó mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop (ThermoScientific, EE. UU).

Las muestras fueron analizadas midiendo la absorbancia a 260 nm para determinar la concentración de ácidos nucleicos, y la relación A260/280 fue utilizada como indicador de pureza del ADN, con valores entre 1.8 y 2.0 considerados óptimos para ADN relativamente libre de contaminantes proteicos. Adicionalmente, se evaluó la relación A260/230 para detectar la posible presencia de contaminantes orgánicos o químicos, tomando como rango aceptable valores entre 2.0 y 2.2.

5.2.12. Síntesis y secuenciación de bibliotecas de Nanopore

Para sintetizar las bibliotecas Nanopore se añadieron 5 μL de agua libre de nucleasas, 10 μL de producto de PCR y 25 μL de enzima Hot Start (New England

Biolabs, EE. UU.). Los productos de PCR fueron purificados en una relación 1:2 utilizando microesferas o perlas magnéticas GenoBeads DNA Magnetic Beads (GenoSur). El producto de PCR junto a las perlas magnéticas se colocó en rack magnético durante 15 min hasta la separación del pellet que luego se extrajo para posteriormente ser sometido a lavado con etanol al 80% recién preparado en una relación 1:5 de etanol al 100% y agua. Se realizaron dos lavados con etanol al 80% dejando secar y sometándose a spin de 1s entre cada lavado. Posteriormente se acopló nuevamente en rack magnético durante 5 min sin etanol. El producto lavado se desligó de las perlas después de un enjuague con agua ultrapura estéril retirándose el sobrenadante.

La cuantificación del amplicón purificado se realizó nuevamente mediante el fluorómetro Qubit 4 (ThermoScientific, EE. UU.) y se empleó como plantilla para la elaboración de la biblioteca usando el kit de Barcoding 16S (SQK-RAB204, Oxford Nanopore Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante para la estrategia de secuenciación en una dimensión (1D). Posteriormente se examinó la calidad de las librerías mediante 2200 Tape Station System (Agilent Technologies, EE. UU.) agregando 3 μ L de buffer y 1 μ L de High Sensitivity D5000 Ladder (Agilent, EE. UU.) de acuerdo con las directrices del fabricante. Conforme a los protocolos de Oxford Nanopore Technologies, las bibliotecas fueron agrupadas para su secuenciación multiplex en la Flow Cell FLO-MIN106-R9.4.1 (Flow cell ID: FAW10428).

Se utilizó el kit rapid sequencing amplicons- 16S barcoding (SQK-16S024) Como control de calidad, se extrajo y se secuenció el ADN de una comunidad microbiana control, o Mock community (ZymoBiomics Microbial Community Standard), siguiendo los mismos pasos descritos, para luego comparar la abundancia observada de las taxas con la esperada. La eficacia de la secuenciación se supervisó mediante el software MinKNOW 2.0 (Oxford Nanopore Technologies).

5.2.13. Análisis bioinformático

Los archivos *raw* en formato fast5 se sometieron a *basecalling* utilizando Guppy (versión 3.2.2, Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) y se seleccionaron aquellas secuencias con un score de calidad $Q \geq 7$. A continuación se realizó la evaluación de la calidad de la secuenciación con a herramienta Pyco QC versión 2.5.2.(Leger & Leonardi, 2019) Para ello, se configuró un entorno virtual de Python en terminal de Ubuntu versión 24.04.1 LTS para garantizar la instalación y ejecución adecuada de los paquetes necesarios. Una vez instalado PycoQC (Leger & Leonardi, 2019), se procesaron los archivos de resumen de secuenciación generados por Guppy.

El demultiplexado y el recorte de adaptadores y barcodes se realizó con la herramienta Porechop. Posteriormente, para realizar la asignación taxonómica de las lecturas procesadas, se utilizó la herramienta EMU (versión 3.4.5) (Curry et al., 2022). Previamente, se configuró un entorno en el sistema operativo

Ubuntu 24.04.1 LTS y se estableció una base de datos personalizada combinando rrnDb 5.6 y NCBI 16S RefSeq. Las lecturas FASTQ generadas en la etapa de demultiplexado y recorte fueron procesadas mediante el comando `emu_abundance`. Este comando se ejecutó de manera iterativa para cada archivo correspondiente a los barcodes de las muestras, especificando parámetros como la conservación de archivos intermedios, matrices de conteo y asignaciones de lecturas.

Las lecturas se mapearon utilizando el algoritmo Minimap2 con un índice optimizado para el tamaño de las secuencias. Los resultados incluyeron matrices de abundancia relativa, conteos taxonómicos y archivos SAM de alineamiento. Este procedimiento permitió cuantificar y validar la asignación taxonómica a nivel de género y especie.

La diversidad alfa de las muestras se estimó mediante los índices de Simpson y Shannon, y la equitatividad se calculó en base al índice de Pielou. Las tablas de abundancia y asignación taxonómica se analizaron en RStudio gracias a los paquetes `phyloseq`, `vegan` y `fantaxtic`.

La composición de la comunidad microbiana se exploró mediante el cálculo de distancias de Bray-Curtis a partir de datos de abundancia relativa por taxón y se efectuó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con el paquete `Vegan` en R (Dixon, 2003). Además, se determinó el linaje taxonómico completo de las secuencias usando la herramienta `TaxonKit` (Shen & Ren, 2021).

Se utilizaron las herramientas de visualización interactiva de datos jerárquicos para cada nivel taxonómico mediante la creación de archivos HTML interactivos con la herramienta Krona (Ondov et al., 2011) en base a las tablas de abundancia relativa creadas en Rstudio. Así mismo, se crearon arboles taxonómicos de calor para una mejor comprensión y visualización de la estructura de las comunidades de cada uno de los grupos en base al paquete Metacoder (Foster et al., 2017) para Rstudio.

Se investigaron las variaciones en la microbiota oral de las ratas a través del trazado de la abundancia relativa a nivel de filo, género y especie, empleando el paquete ggplot2 de R. El core microbiome se identificó aplicando un umbral de prevalencia del 80% y una abundancia relativa mínima del 1%.

5.2.14. Predicción de vías metabólicas funcionales

Se llevó a cabo la predicción de las vías metabólicas funcionales para todo el microbioma utilizando la herramienta Picrust 2.0 (Douglas et al., 2020c) a partir de secuencias de amplicón del ARNr 16S full habiendo previamente recuperado las secuencias en formato FASTA para cada TaxID utilizando la herramienta Geneious (by Dotmatics) Los gráficos de las vías funcionales se construyeron utilizando la base de datos MetaCyc.(Caspi et al., 2016b) La gráfica de abundancia relativa se construyó utilizando RStudio. Los análisis estadísticos se realizaron en la plataforma STAMP 2.1.3 (Parks et al., 2014), aplicando pruebas ANOVA para detectar diferencias entre los grupos experimentales, seguidas de

pruebas post-hoc de Tukey-Kramer para identificar comparaciones específicas entre los 4 grupos. La corrección para pruebas múltiples se realizó mediante el método Benjamini-Hochberg (FDR) para ajustar los valores de p , estableciendo un umbral de p ajustado < 0.05 . Además, se evaluó el tamaño del efecto utilizando eta-squared (η^2) con un valor de 0.80 para realizar comparaciones entre dos grupos, basándose además en la diferencia en la proporción de las medias junto con los intervalos de confianza proporcionados por la prueba de t de Welch de dos colas considerando el método DP Welch's inverted (0,95). Para estas mismas comparaciones específicas entre las medias de los distintos grupos además se utilizó la prueba (Yadav & Kapley, 2019). Para la construcción de gráficos, se utilizaron datos con una abundancia relativa mínima de 0,5 para determinar la diferencia de proporciones.

5.2.15. Análisis de muestras de suero por TEM

Se analizaron las muestras de suero sanguíneo, obtenidas mediante punción cardíaca de las ratas, para evaluar la presencia de nanopartículas de cobre en el fluido. Para ello, se empleó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las muestras de suero se diluyeron en una proporción de 1:6 con etanol al 50% para evitar una concentración excesiva que impida la correcta transmisión del haz de electrones. A continuación, se depositó una gota de esta dilución sobre una grilla de nitrocelulosa y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca, la grilla se colocaron sobre el porta muestras de un microscopio electrónico transmisión modelo JEOL JSM-6380LV. Se examinó la muestra en búsqueda de

nanopartículas que sean compatibles con el cobre y, al detectarlas, se empleó una técnica de difracción de electrones para medir la intensidad de las partículas observadas. Finalmente, se fotografiaron las muestras para su análisis detallado.

5.2.16. Preparación de muestras de túbulo colector renal para análisis SEM-EDS

Para evaluar la posible acumulación de nanopartículas de cobre en los túbulos colectores renales, las muestras de tejido renal fueron procesadas mediante microscopía electrónica de barrido con espectroscopía de dispersión de energía (SEM-EDS). Los procedimientos incluyeron etapas de fijación, deshidratación y recubrimiento, diseñadas para preservar la integridad estructural del tejido y garantizar la calidad de las imágenes obtenidas. (Anderson, 1951)

Fijación y postfijación: Los tejidos fueron fijados inicialmente en una solución de glutaraldehído al 2.5 % en buffer cacodilato de sodio (0.1 M, pH 7.2) a 4 °C para estabilizar las estructuras celulares. Posteriormente, se realizó una postfijación con tetróxido de osmio al 1 %, conocida por mejorar el contraste y la preservación de lípidos y membranas, seguida de lavados intermedios.

Deshidratación: Las muestras se sometieron a una serie gradual de inmersiones en soluciones de etanol con concentraciones crecientes, finalizando con etanol absoluto para eliminar completamente el agua del tejido, un paso crítico para evitar artefactos durante la visualización.

Secado por punto crítico: Se utilizó un sistema de secado con dióxido de carbono líquido, permitiendo la eliminación del solvente sin colapsar las estructuras internas del tejido. Este método asegura que los tejidos mantengan su morfología original durante el análisis.

Recubrimiento de oro: Las muestras fueron recubiertas con una capa delgada de oro mediante pulverización catódica, lo que aumenta su conductividad y mejora la resolución de las imágenes obtenidas por SEM.

5.2.17. Cálculo del Tamaño muestral

Suponiendo una diferencia del 20 % en los resultados medios entre los grupos, un análisis de poder sugirió que una muestra mínima de 3 muestras por grupo apoyaría el análisis con un 80% de poder y un 5% de significación. Se consideró un individuo adicional considerando la tasa de error de los procedimientos quirúrgicos.(Charan & Kantharia, 2013)

Inicialmente se planificó utilizar 3 ratas y 5 variables de desinfección. Requiriendo un total de 15 ratas. En el contexto de este estudio considerado como piloto, es importante destacar que este cálculo del tamaño de muestra asegura que el trabajo experimental tenga una alta probabilidad de detectar una diferencia significativa en el peso corporal (por ejemplo), si existe, al tiempo que controla el riesgo de cometer un error de tipo I (falso positivo) a un nivel de significancia del 5%. La potencia del 90 % que se contempla indica la probabilidad de detectar un efecto real si está presente. Esto implica que, incluso en un estudio inicial como

este, se mantiene una rigurosa consideración del nivel de significancia para garantizar la confiabilidad de los resultados y minimizar los errores estadísticos. Se considera un individuo adicional considerando la tasa de error de los procedimientos de desinfección. Por lo tanto, se estimó que cada variable de desinfección requería una muestra mínima de 3 especímenes. Se añadió 1 espécimen más en caso de dar punto final a alguna rata. En conclusión, se determinó un número de 4 ratas por variables, utilizando un total de 16 ratas.(Charan & Kantharia, 2013)(X. Wang et al., 2020)

5.2.18. Consideraciones Bioéticas

La adhesión rigurosa a los principios éticos se aseguró en base a los lineamientos de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Science National Research Council), los principios elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, Organización Mundial de la Salud (1985), el texto "Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal", editado por CONICYT en 2009, y el "Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados" editado por CONICYT en 2018 y se sustenta bajo el principio de las 3R: Reemplazo, Reducción y Refinamiento, en conjunto con los principios de la Declaración de Helsinki adaptados para un enfoque en investigación clínica animal. (Ashall et al., 2023)

Integrando estas consideraciones éticas, se obtuvo el informe del Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas y la aprobación N°

CEBB 775-2020-M del Comité de Ética Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y desarrollo de la Universidad de Concepción. Conforme a esto, este proyecto se ajusta a la legislación chilena vigente sobre el manejo de materiales biológicos y residuos peligrosos. La Universidad de Concepción supervisó el cumplimiento de lo anterior a través de su “Plan de manejo de sustancias y residuos peligrosos (MATPEL), asegurando el tratamiento adecuado de todos los residuos generados en la presente investigación.

5.2.19. Pruebas estadísticas

Para la evaluación de las variables de alfa diversidad, se calcularon los índices de riqueza, Chao1, Shannon, Simpson y Evenness. Además, todas las variables relacionadas con los parámetros sanguíneos obtenidos por punción cardiaca, el peso corporal diario, el peso de los órganos por grupo, el consumo diario de alimentos y las mediciones de OD a 570 nm para la actividad ALT (determinada mediante el kit colorimétrico) fueron analizadas siguiendo un enfoque estadístico sistemático.

Primero, se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. Según los resultados de estas pruebas, se seleccionaron análisis paramétricos o no paramétricos. En los casos que cumplieron con los supuestos, se utilizó un ANOVA de un factor para comparar las medias entre los grupos. En los casos

donde no se cumplieron, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis como alternativa no paramétrica. Para las comparaciones post hoc en las variables con diferencias significativas ($p < 0.05$), se utilizaron pruebas de Tukey HSD en los análisis paramétricos y la prueba de Wilcoxon en los análisis no paramétricos. Estos análisis fueron realizados en el software RStudio, utilizando las librerías “ggplot2”, “car”, “carData”, “dplyr” y “paletteer”. Los resultados fueron representados gráficamente para facilitar su interpretación.

En el análisis de diversidad beta, se calcularon distancias Bray-Curtis, Jaccard y euclidianas a partir de los datos de abundancia relativa procesados en el software RStudio utilizando el paquete phyloseq. Las distancias Bray-Curtis y Jaccard se emplearon para realizar análisis de ordenación mediante PCoA (Principal Coordinates Analysis) y clustering jerárquico. Se evaluó también, la existencia de diferencias significativas a través de pruebas estadísticas tales como PERMANOVA y pairwise PERMANOVA para comparar entre grupos de estudio. Las distancias euclidianas se usaron específicamente para generar un dendrograma basado en clustering jerárquico, utilizando el método de agrupamiento completo.

Para PCoA, se representaron los grupos de tratamiento mediante elipses de confianza y puntos coloreados de acuerdo con las categorías asignadas. Adicionalmente, se creó un *heatmap* para las distancias Jaccard con agrupamiento jerárquico de muestras y tratamientos. Todas las visualizaciones,

incluidas las representaciones de dendrogramas, se generaron empleando las librerías ggplot2 y pheatmap.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación de la calidad y cantidad del ADN extraído y procesamiento de Librerías para Secuenciación.

6.1.1. Amplificación del gen 16S rRNA por PCR

En las imágenes de gel de agarosa (**Fig. 9**), se observa la amplificación exitosa del gen *16S rRNA* de aproximadamente 1500 pb para la mayoría de las muestras

de microbiota oral analizadas. En la **Figura 9A**, los carriles 2 al 7 corresponden a los grupos tratados con gel de clorhexidina durante 7 días (CHX7d) y gel de nanopartículas de cobre durante 7 días (NG7d). Los carriles muestran una única banda bien definida, lo que indica una amplificación sin productos inespecíficos.

Por su parte, la **Figura 9B** incluye los resultados para los grupos control sin antisepsia y tratados con nanopartículas de cobre durante 30 días (NG30d). De manera similar, los carriles presentan una banda clara correspondiente al tamaño esperado del gen *16S rRNA* (1500 pb). No se detectaron fragmentos adicionales, sugiriendo que los pasos de purificación y eliminación de contaminantes fueron efectivos. Además, los controles positivos muestran amplificación adecuada, mientras que los controles negativos no presentan bandas, confirmando la ausencia de contaminación en el proceso.

En el carril 5 de la **Figura 9B**, correspondiente a la muestra R1NG30d, no se observó amplificación del fragmento esperado debido a error de manipulación durante la carga de la muestra. Posteriormente, la PCR y la electroforesis de esta muestra fueron repetidas exitosamente, obteniéndose los resultados esperados sin inconvenientes.

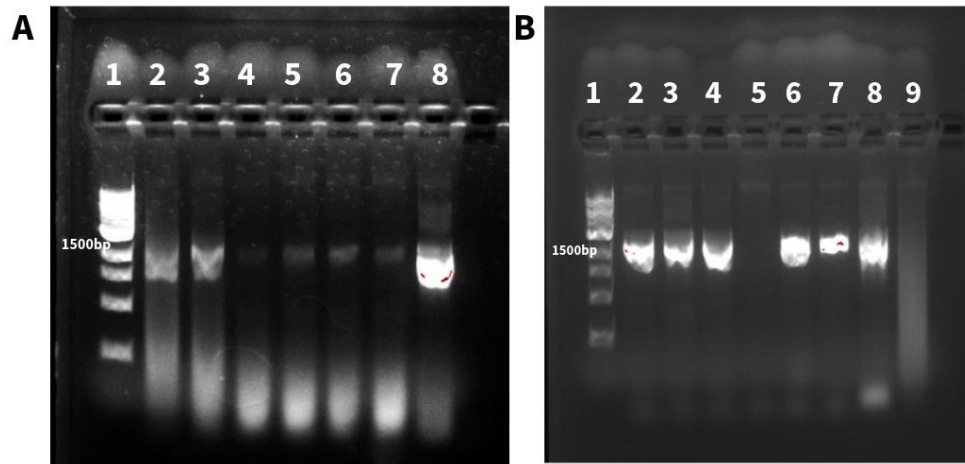


Figura 9. Visualización de los productos de amplificación del gen 16s rRNA (1500bp aprox.) mediante PCR. A) 1. Marcador de peso molecular, 2. R1CHX7d, 3. R2CHX7d, 4. R4CHX7d, 5. R1NG7d, 6. R2NG7d, 7. R3NG7d, 8. Control positivo. B) 1). Marcador de peso molecular, 2. R1CONTROL, 3. R2CONTROL, 4. R3CONTROL, 5. R1NG30d, 6. R2NG30d, 7. R3NG30d, 8. Control positivo, 9. Control Negativo. Fuente: Elaboración propia.

6.1.2. Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN tras la limpieza de librerías

Las gráficas y tablas presentadas dan cuenta de los resultados obtenidos mediante el análisis en TapeStation 2200 para cuatro muestras representativas de los grupos experimentales: CONTROL, CHX7d, NG7d y NG30d. Este análisis permitió evaluar tanto la calidad como la cantidad de ADN tras la limpieza de las librerías.

Grupo Control si aseptizar (R1CONTROL): Se observó un único pico mayoritario correspondiente a un fragmento de aproximadamente 1466 pb, con una concentración total de 2930 pg/μl, representando el 97.65 % del área integrada, lo que confirma la calidad esperada del ADN tras la limpieza (Fig.10 y

Tabla 3)

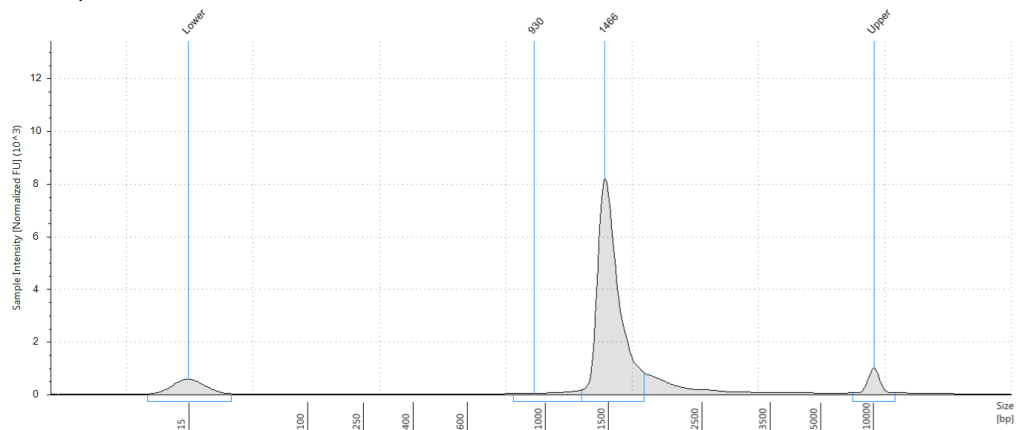


Figura 10. Electroferograma del perfil de intensidad de ADN tras la limpieza de librerías para la muestra R1CONTROL. Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del TapeStation 2200.

Tabla 3. Tabla de cuantificación y caracterización del ADN para la muestra R1CONTROL del grupo Control. Fuente: Elaboración propia en base a resultados de TapeStation 2200.

Sample Table						
Well	Conc. [pg/μl]	Sample Description	Alert	Observations		
B1	3000	Rata: R1CONTROL				
Peak Table						
Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Assigned Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
15	298	-	30500	-		Lower Marker
930	70.6	-	117	2.35		
1466	2930	-	3070	97.65		
10000	180	180	27.7	-		Upper Marker

Grupo tratado con Chlorhexidina al 2 % durante 7 días (R2CHX7d): El análisis reveló un pico dominante de 1475 pb con una concentración de 1550 pg/μl. Esto confirma la ausencia de contaminantes de tamaño no deseado, con un 100 % del área integrada. (Fig. 11 y Tabla 4).

Grupo Tratado con Chlorhexidina al 2 % durante 7 días: CHX7d

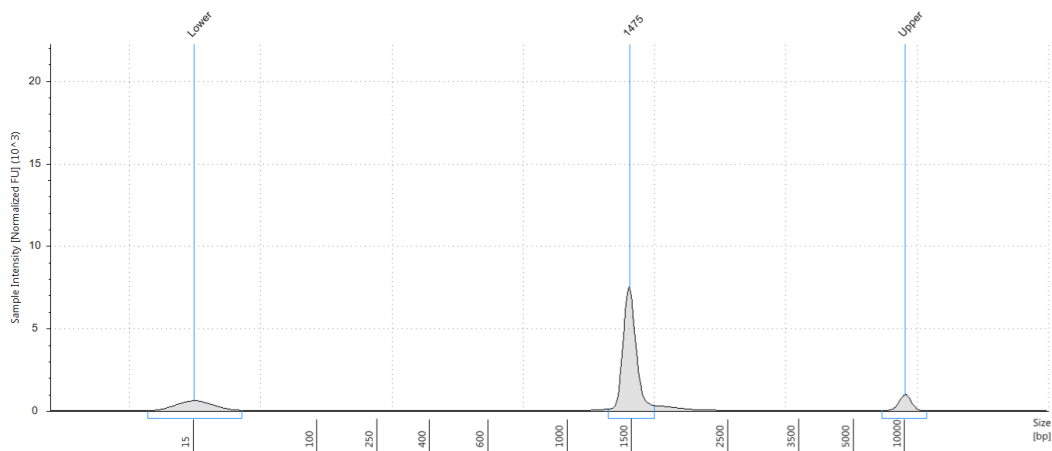


Figura 11. Electroferograma del perfil de intensidad de ADN obtenido tras limpieza de librerías para la muestra R2CHX7d. Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del TapeStation 2200.

Tabla 4. Tabla de cuantificación y caracterización del ADN para la muestra R2CHX7d del grupo tratado con Clorhexidina al 2 % durante 7 días. Fuente: Elaboración propia en base a resultados de TapeStation 2200.

Sample Table						
Well	Conc. [pg/μl]	Sample Description	Alert	Observations		
G1	1550	Rata: R2CHX7d				
Peak Table						
Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Assigned Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
15	338	-	34600	-		Lower Marker
1475	1550	-	1620	100.00		
10000	180	180	27.7	-		Upper Marker

Grupo tratado con NpCu durante 7 días (R1NG7d): La muestra mostró un pico principal en 1634 pb con una concentración de 13000 pg/μl y un 97.63 % del área integrada, corroborando la eficacia de la limpieza de librerías en este grupo.

(Fig.12 y Tabla 5)

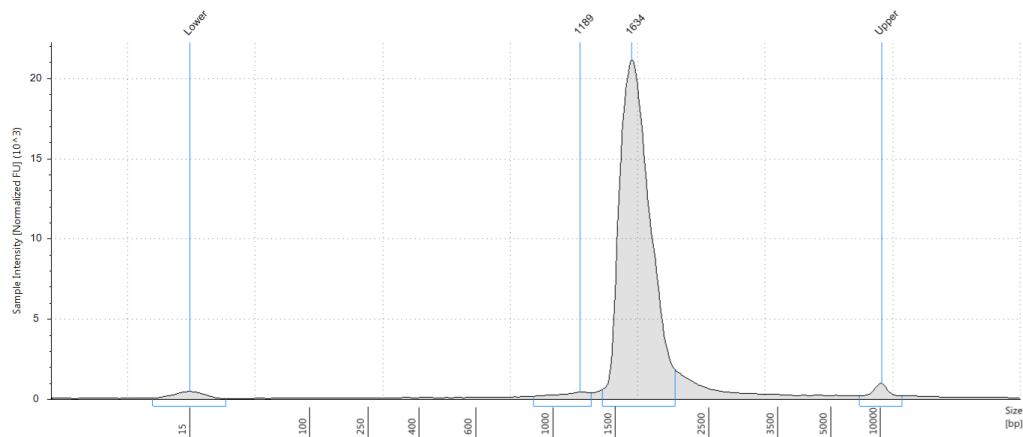


Figura 12. Electroferograma del del perfil de intensidad de ADN obtenido tras limpieza de librerías para la muestra R1NG7d. Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del TapeStation 2200.

Tabla 5. Tabla de cuantificación y caracterización del ADN para la muestra R1NG7d.
Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del TapeStation 2200.

Sample Table						
Well	Conc. [pg/ μ l]	Sample Description	Alert	Observations		
A2	13300	Rata: R1NG7d				
Peak Table						
Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/ μ l]	Assigned Conc. [pg/ μ l]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
15	256	-	26300	-		Lower Marker
1189	314	-	407	2.37		
1634	13000	-	12200	97.63		
10000	180	180	27.7	-		Upper Marker

Grupo tratado con NpCu durante 30 días (R1NG30d): Se detectó un pico en 1723 pb, con una concentración total de 6630 pg/ μ l, abarcando el 96.55 % del área integrada. A pesar de observarse una ligera señal adicional en tamaños mayores, esto se atribuye a posibles artefactos del dispositivo de análisis debido al uso de un ScreenTape vencido, según la observación técnica registrada. (Fig. 13 y Tabla 6)

Grupo tratado con NpCu durante 30 días: NG30d

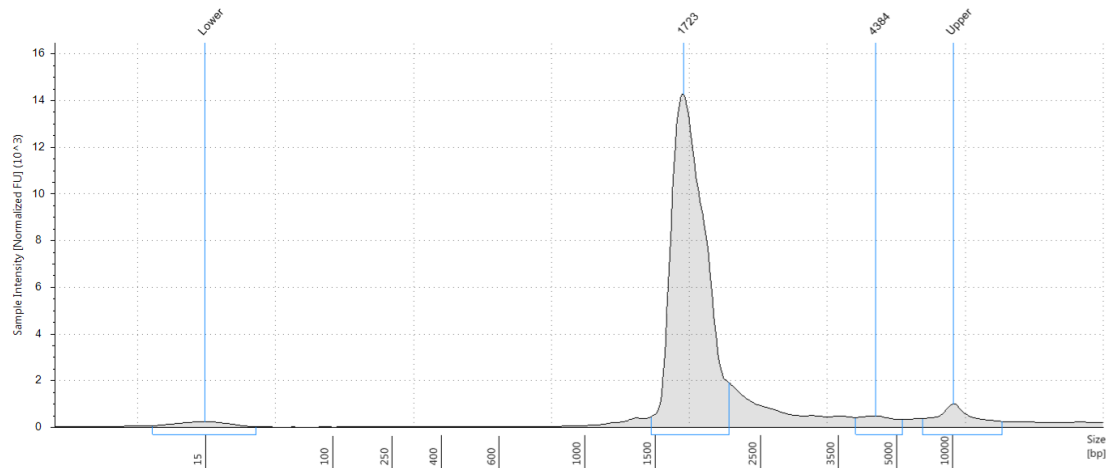


Figura 13. Electroferograma representativo de la cuantificación de ADN en la muestra R1NG30d del grupo tratado con nanopartículas de cobre durante 30 días (NG30d). Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del TapeStation 2200.

En todas las muestras analizadas, los perfiles obtenidos evidencian un predominio de fragmentos que coinciden con el tamaño esperado del gen 16S rRNA, aproximadamente 1550 pb, en concordancia con los objetivos establecidos para la preparación de librerías. Es importante destacar que la pureza del ADN extraído fue evaluada inicialmente mediante espectrofotometría de microvolumen (NanoDrop), obteniéndose ratios de absorbancia 260/280 entre 1.89 y 2 en todas las muestras, valores que cumplen con las recomendaciones para procedimientos moleculares posteriores. Adicionalmente, se llevó a cabo una evaluación complementaria de la calidad y pureza mediante métodos basados en fluorescencia (Qubit 4), asegurando una cuantificación precisa del ADN extraído y de las librerías procesadas antes de proceder a la secuenciación.

Estos resultados confirman la integridad y calidad óptima del ADN, garantizando su idoneidad para los análisis de secuenciación subsecuentes.

Tabla 6.Tabla de cuantificación y caracterización del ADN para la muestra R1NG30d. Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del TapeStation 2200.

Sample Table						
Well	Conc. [pg/μl]	Sample Description			Observations	
F1	6870	Rata: R1NG30d			Caution! Expired ScreenTape device	

Peak Table						
Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Assigned Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
15	104	-	10700	-		Lower Marker
1723	6630	-	5920	96.55		
4384	237	-	83.2	3.45		
10000	180	180	27.7	-		Upper Marker

6.2. Calidad de Secuenciación Evaluada mediante PycoQC

La calidad de las secuencias generadas fue evaluada utilizando los archivos resumen producidos por Guppy, centrando el análisis en las 16 muestras experimentales y una comunidad control ("Mock community"). En total, se obtuvieron 6,272,145 lecturas, equivalentes a 4.5 Gb de datos, de las cuales 3,826,207 lecturas (2.92 Gb) cumplieron con los criterios de calidad establecidos, definidos por un puntaje de calidad mínimo ($Q \geq 7$). Estos resultados reflejan una

producción de datos consistente y de alta calidad, adecuada para los análisis posteriores.

El análisis reveló que el valor de N50 de las lecturas que superaron los filtros de calidad fue de 1310 pares de bases, indicando una representación predominante de fragmentos largos, como lo es el gen *16S rRNA*. La longitud mediana de las lecturas filtradas alcanzó los 553 pb, lo cual se considera adecuado para los objetivos del estudio, que incluyen la asignación taxonómica precisa y el análisis funcional de la microbiota. En cuanto a la calidad promedio de las lecturas, el puntaje PHRED registrado fue de 8.52, lo cual a pesar de no ser muy alto si confirma que los datos cumplen con estándares aceptables para la tecnología de secuenciación utilizada (Oxford Nanopore Technology).

El 90 % de las lecturas presentó longitudes superiores a 1293 pares de bases, lo que refuerza la idoneidad de las secuencias generadas para el análisis de fragmentos genómicos completos. Los gráficos de densidad elaborados a partir de estos datos (**Figuras 14 y 15**) muestran que la mayor concentración de lecturas con puntajes PHRED superiores a 8 se encuentra en el rango de longitudes comprendido entre 500 y 1500 pares de bases, lo cual es consistente con el tamaño aproximado dentro del cual puede fluctuar el gen en base a nuestro diseño experimental.

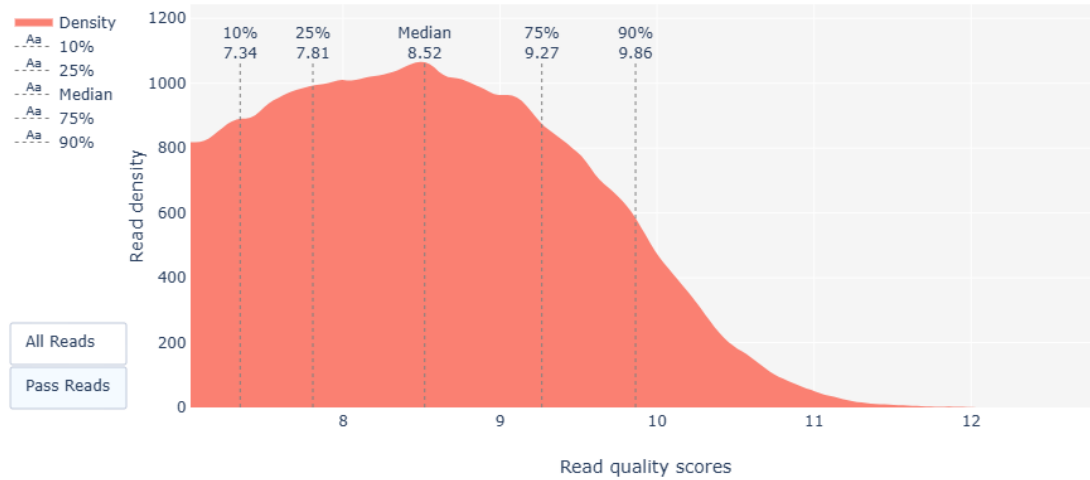


Figura 14. Gráfico de la distribución de densidad de los puntajes de calidad PHRED de las lecturas que pasaron los filtros de calidad durante la secuenciación. Fuente: Elaboración propia en base PycoQC.

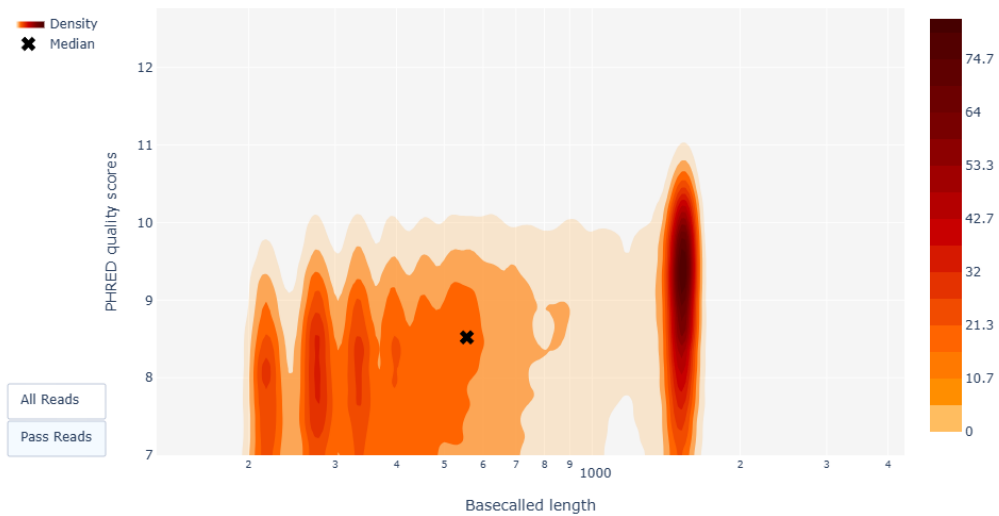


Figura 15. Gráfico de relación entre los puntajes de calidad PHRED y la longitud de las lecturas basecall en las lecturas que pasaron los filtros de calidad (Pass reads). Fuente: Elaboración propia en base PycoQC.

Finalmente, en cuanto a la calidad y longitud de las lecturas a lo largo del tiempo, es posible dar cuenta de que esta se mantuvo constante durante las 23.8h de

duración de la corrida experimental en base a la medición del PHRED score, reafirmando la estabilidad de la secuenciación durante toda su extensión.

6.3. Asignación taxonómica con EMU

Se utilizó EMU para generar las asignaciones taxonómicas a partir de los datos procesados anteriormente con Porechop. Cada barcode correspondió a una muestra experimental de acuerdo con el tratamiento recibido. El porcentaje de reads asignados fue variable entre barcodes, oscilando desde valores mínimos de 1.3 % (R3CHX7d) hasta máximos superiores al 72 % (R3CONTROL). Esto refleja diferencias en la calidad de las lecturas y la efectividad de la asignación taxonómica para ciertos grupos.

El número de iteraciones del algoritmo de maximización de expectativas (Expectation-Maximization, EM) que utiliza el software EMU osciló entre 24 y 53, dependiendo de la complejidad de las lecturas y su asignación.

Cabe destacar, que se utilizaron volúmenes de 3-8 μL por muestra, optimizando el uso de ADN según la concentración inicial ($\text{ng}/\mu\text{L}$) disponible para cada barcode.

Las tendencias generales mostradas en la **Tabla 7** indican que los grupos control (R3CONTROL y R4CONTROL) presentan los mayores porcentajes de reads asignados (72.5 % y 97.7 %, respectivamente), indicando una mayor calidad en la asignación taxonómica en comparación con los grupos tratados.

Por otra parte, las muestras tratadas con NPCu durante 30 días (R1NG30d a R4NG30d) muestran bajos porcentajes de reads asignados (entre 3.9 % y 6.5%), a pesar de haber realizado un volumen constante de secuenciación de 5 µL.

Con relación a las iteraciones del algoritmo EM fueron más altas en las muestras con asignaciones complejas, como R3CONTROL (53 iteraciones) y R3NG7d (47 iteraciones), lo que sugiere mayor complejidad en los datos taxonómicos procesados.

Finalmente, el grupo tratado con CHX al 2 % por 7 días, R4CHX7d destaca con una asignación exitosa del 90.3 % de los reads, mientras que R3CHX7d tuvo un desempeño muy bajo (1.9 %). Esto sugiere una correlación entre el tipo de tratamiento, los días de exposición y el porcentaje de asignación taxonómica, dando cuenta de que en aquellas muestras del grupo control existen asignaciones que se condicen con una asignación más robusta, mientras que en los grupos tratados con NPCu o CHX existen mayores desafíos en la clasificación taxonómica.

Tabla 7. Resumen de los resultados de asignación de lecturas a taxones utilizando EMU para cada muestra. Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Tratamiento	[DNA] ng/ μ L	Barcode	Vol. Seq. (μ L)	Reads Asignados	Reads No Asignados	% Reads Asignados	Iteraciones EM
R1CHX7d	CHX 2%	4,8	24	5	22077	23082	48.9%	37
R2CHX7d	CHX 2%	1,31	7	5	4048	4239	48.8%	24
R3CHX7d	CHX 2%	0,7	8	5	354	18550	1.9%	25
R4CHX7d	CHX 2%	6,9	9	5	47187	5077	90.3%	29
R1NG7d	NPCu	30,8	16	4	27735	337467	7.6%	40
R2NG7d	NPCu	15,8	17	8	27995	353316	7.3%	44
R3NG7d	NPCu	44,2	18	3	22041	352137	5.9%	47
R4NG7d	NPCu	44,4	19	3	23739	326941	6.8%	52
R1CONTROL	Sin TTO	29,4	10	4	157813	126312	55.5%	41
R2CONTROL	Sin TTO	26	12	5	201563	101006	66.6%	39
R3CONTROL	Sin TTO	26,8	14	5	268070	101941	72.5%	53
R4CONTROL	Sin TTO	23	15	5	222304	5150	97.7%	36
R1NG30d	NPCu	3,22	20	5	2310	34766	6.2%	30
R2NG30d	NPCu	4,92	21	5	2545	36284	6.5%	30
R3NG30d	NPCu	3,68	22	5	2115	51676	3.9%	36
R4NG30d	NPCu	7,66	23	5	5450	78959	6.5%	34

6.4. Evaluación de la diversidad alfa

El análisis de la diversidad alfa en la microbiota oral de los cuatro grupos experimentales reveló aspectos importantes en cuanto a riqueza, equidad y diversidad de las comunidades microbianas. La prueba de normalidad Shapiro-Wilk (**Tabla 8**) indicó que, para métricas como riqueza y Chao1, algunos grupos, como el CONTROL, no presentaron una distribución normal ($p < 0.05$). Esto justificó el uso de pruebas no paramétricas en las comparaciones. Por otro lado,

la homogeneidad de las varianzas entre los grupos fue confirmada mediante la prueba de Levene (**Tabla 9**), lo que asegura consistencia en la homocedasticidad de las métricas entre tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 8. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk aplicada a las métricas de diversidad alfa en los diferentes grupos de tratamiento. Los valores del estadístico W y los p-valores se presentan para cada grupo y métrica evaluada. Fuente: Elaboración propia.

Variable	Grupo	W (Estadístico)	p-valor
Riqueza	CHX7d	0.781	0.072
	NG7d	0.947	0.700
	CONTROL	0.715	0.017
	NG30d	0.888	0.375
Chao1	CHX7d	0.982	0.916
	NG7d	0.947	0.700
	CONTROL	0.715	0.017
	NG30d	0.888	0.375
Índice de Shannon	CHX7d	0.904	0.454
	NG7d	0.876	0.325
	CONTROL	0.794	0.091
	NG30d	0.854	0.239
Índice de Simpson	CHX7d	0.857	0.250
	NG7d	0.690	0.009
	CONTROL	0.921	0.547
	NG30d	0.878	0.331
Evenness	CHX7d	0.935	0.624
	NG7d	0.715	0.017
	CONTROL	0.7813	0.072
	NG30d	0.8262	0.158

Tabla 9. Resultados de la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas entre los grupos en las diferentes métricas de diversidad alfa. Fuente: Elaboración propia.

Variable	F (Estadístico)	p-valor	Conclusión
Riqueza	0.0929	0.9625	Varianzas homogéneas ($p > 0.05$)
Chao1	0.1192	0.947	Varianzas homogéneas ($p > 0.05$)
Índice de Shannon	0.2304	0.8734	Varianzas homogéneas ($p > 0.05$)
Índice de Simpson	1.4115	0.2875	Varianzas homogéneas ($p > 0.05$)
Evenness	0.3192	0.8114	Varianzas homogéneas ($p > 0.05$)

El análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis (**Tabla 10**) mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas en las métricas evaluadas (Riqueza, Chao1, Shannon, Simpson y Evenness) entre los grupos ($p > 0.05$). Adicionalmente, la comparación entre los grupos CONTROL y NG30d para la equidad (Evenness), usando la prueba de Wilcoxon (**Tabla 9**), tampoco mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 10. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas entre los cuatro grupos en las métricas de diversidad alfa. Fuente: Elaboración propia.

Variable	Chi-cuadrado (Estadístico)	<i>p</i> -valor	Conclusión
Richness	4.5221	0.2103	No hay diferencias significativas ($p > 0.05$)
Chao1	2.9779	0.395	No hay diferencias significativas ($p > 0.05$)
Shannon	2.7574	0.4306	No hay diferencias significativas ($p > 0.05$)
Simpson	0.55147	0.9074	No hay diferencias significativas ($p > 0.05$)
Evenness	2.7132	0.438	No hay diferencias significativas ($p > 0.05$)

Tabla 11. Resultados de la prueba de Wilcoxon para comparar la métrica de equidad (Evenness) entre los grupos CONTROL y NG30d. Fuente: Elaboración propia.

Variable	Grupos Comparados	W (Estadístico)	<i>p</i> -valor	Conclusión
Evenness	CONTROLvs. NG30d	4	0.3429	No hay diferencias significativas ($p > 0.05$)

En términos visuales, los *boxplots* de las variables diversidad alfa (**Figuras 16, 17 y 18**) destacaron que las medias y rangos intercuartílicos son similares entre los grupos, lo que apoya la ausencia de diferencias significativas identificadas en las pruebas estadísticas.

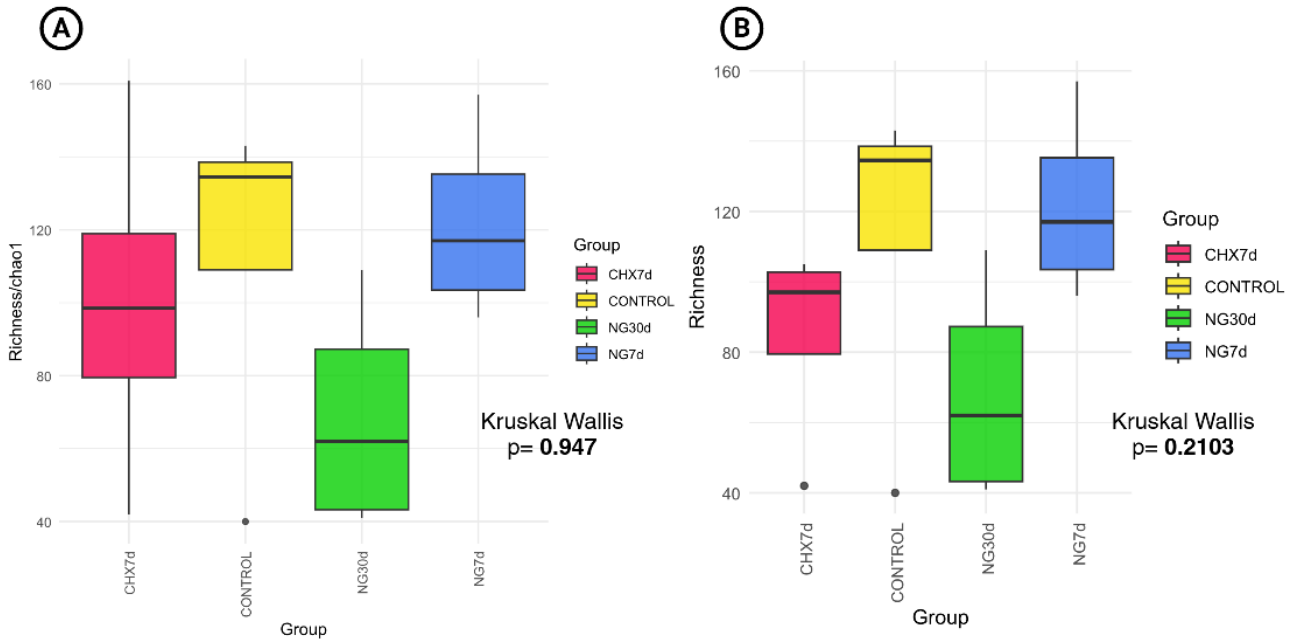


Figura 16. *Boxplots* para las métricas de riqueza Chao1 **(A)** y Richness **(B)** en los diferentes grupos de tratamiento (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d). Fuente: Elaboración propia.

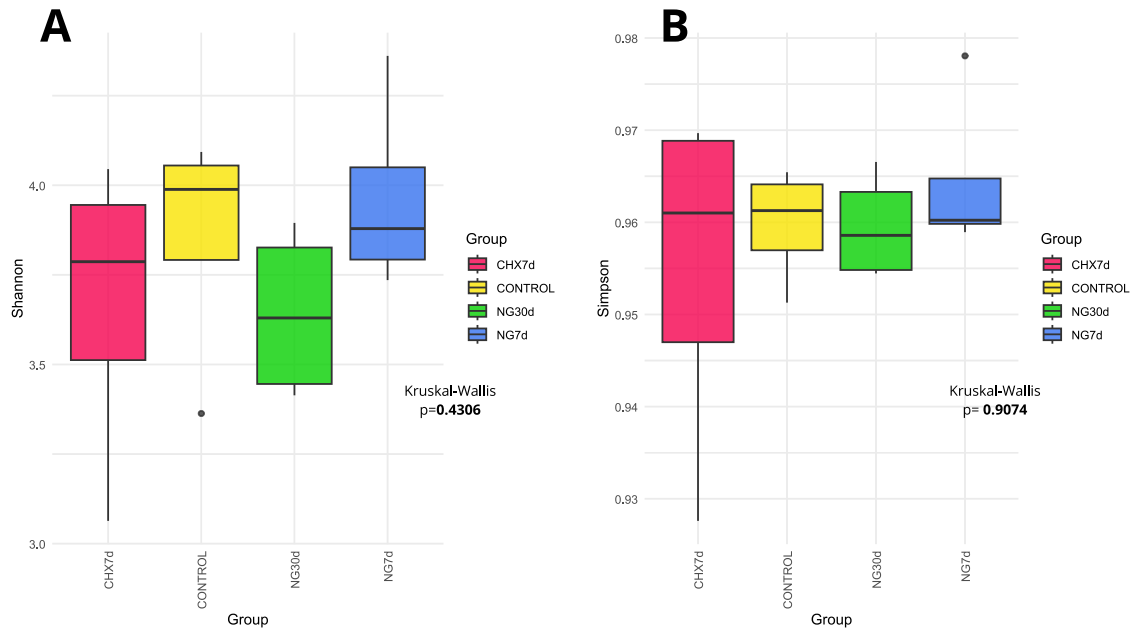


Figura 17. *Boxplots* que ilustran las métricas de diversidad alfa basadas en los índices de Shannon (A) y Simpson (B) para los diferentes grupos de tratamiento (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d). Fuente: Elaboración propia.

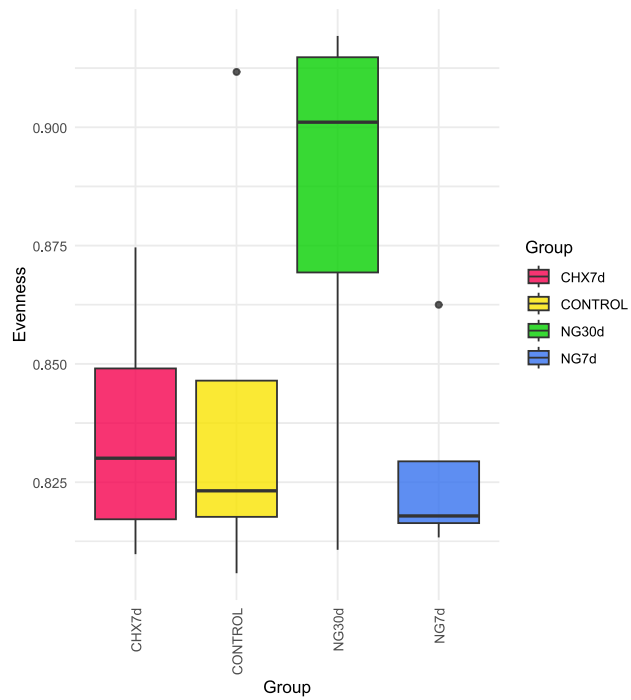


Figura 18. Boxplot que representa los valores del índice de uniformidad de Pielou (Evenness) para los diferentes grupos de tratamiento (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d). Fuente: Elaboración propia.

Cada curva de rarefacción (**Figura 19**) refleja la cobertura taxonómica alcanzada para cada grupo, indicando que los grupos se aproximan a la saturación, aunque no alcanzan el plateau completo. En total, se identificaron 454 taxones únicos combinando todas las muestras, con diferencias en el número acumulado de taxones entre los grupos.

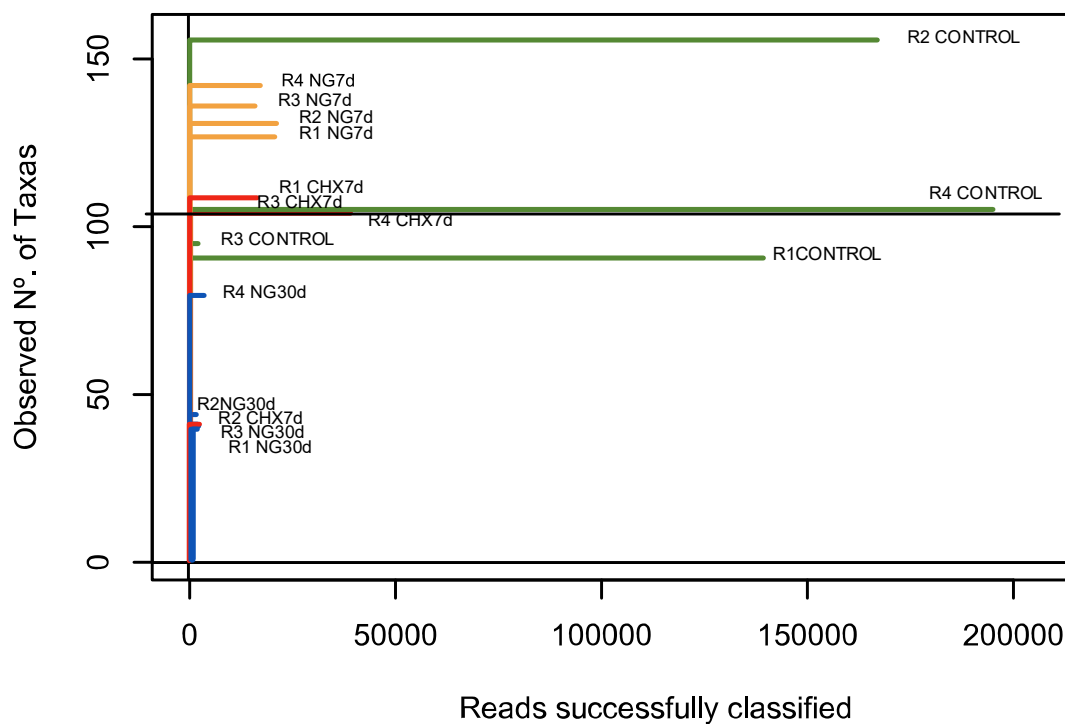


Figura 19. Curvas de rarefacción generadas para las muestras de los distintos grupos de tratamiento (CHX7d, NG7d, CONTROL, y NG30d) de la microbiota oral de las ratas. Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados sugieren que las intervenciones aplicadas a los distintos grupos no generaron un impacto significativo en la diversidad alfa de la microbiota oral.

Sin embargo, es relevante considerar que los parámetros iniciales, como la dieta estandarizada, podrían influir en los resultados obtenidos. La evaluación detallada y la integración de datos visuales y estadísticos refuerzan la confiabilidad de los hallazgos, proporcionando una comprensión integral de las variaciones en las comunidades microbianas bajo los tratamientos evaluados.

6.5. Evaluación de la diversidad Beta

El análisis de diversidad beta permitió identificar diferencias significativas que repercuten en la composición y estructura de las comunidades bacterianas entre los grupos NG7, NG30d, CHX7d y el grupo control. Este análisis, basado en índices de abundancia relativa (Bray-Curtis) y presencia/ausencia de taxones (Jaccard), proporcionó una panorámica de cómo los tratamientos afectan de manera diferencial a la microbiota oral.

En el análisis de coordenadas principales (PCoA), se observó una separación clara entre los grupos experimentales (**Figura 20**). Los grupos tratados con nanopartículas de cobre mostraron una diferenciación marcada en comparación con los tratados con clorhexidina y el grupo control. Este patrón sugiere que las nanopartículas de cobre inducen cambios profundos en la composición bacteriana, posiblemente relacionados con su actividad antimicrobiana específica y su capacidad para modular ciertas especies bacterianas. En contraste, la clorhexidina mostró un impacto más generalizado, pero menos pronunciado, sobre la estructura de la microbiota.

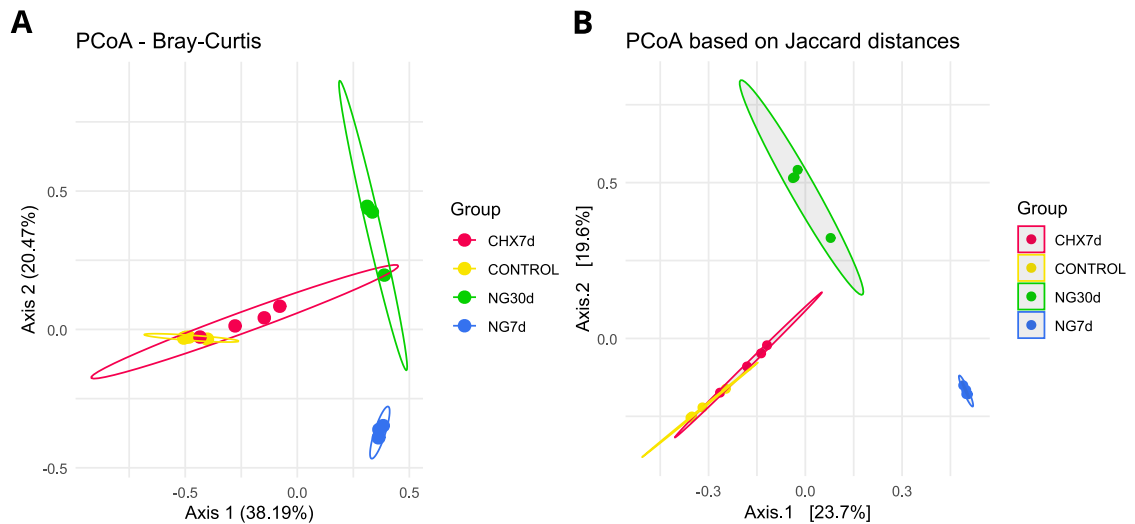


Figura 20. Análisis de coordenadas principales (PCoA). (A) PCoA basado en Bray-Curtis mostrando diferencias en la abundancia relativa. (B) PCoA basado en Jaccard, centrado en la presencia/ausencia de taxones. Los colores representan los distintos grupos experimentales. Fuente: Elaboración propia.

El dendrograma jerárquico basado en distancias de Bray-Curtis (**Figura 21 A**) destacó la similitud entre muestras dentro de los mismos tratamientos, con clados bien definidos para los grupos NG7d y NG30d. Esto último sugiere que la aplicación de nanopartículas de cobre produce comunidades bacterianas estructuralmente más homogéneas, posiblemente debido a un efecto selectivo sobre ciertas poblaciones microbianas. Complementariamente, el *heatmap* de distancias Jaccard (**Figura 21 B**) reveló mayores disimilitudes entre los grupos tratados con nanopartículas y los demás, con patrones de separación más

evidentes en las muestras de NG30d, lo que podría indicar un efecto acumulativo tras exposiciones prolongadas.

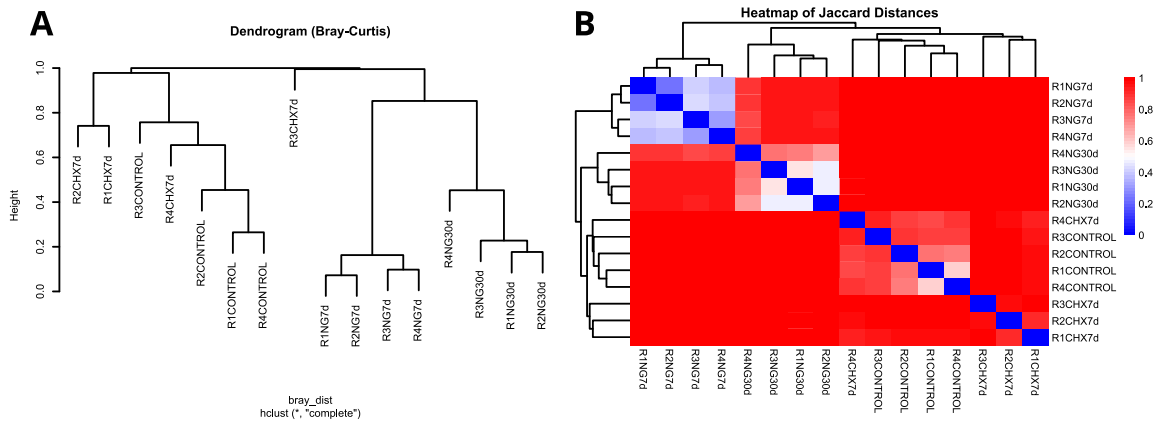


Figura 21. Análisis jerárquico y de disimilitud. A) Dendrograma basado en distancias Bray-Curtis. B) Heatmap de distancias de Jaccard. Los tonos azules indican mayor similitud entre muestras, mientras que los tonos rojos reflejan mayor disimilitud.

El análisis estadístico mediante PERMANOVA (**Tabla 12**) confirmó diferencias significativas en la composición de la microbiota entre los grupos ($F = 2.43$, $p = 0.008$). En particular, se encontró una diferenciación estadísticamente significativa entre los grupos CHX7d y CONTROL ($p = 0.029$), mientras que las comparaciones entre NG7d y NG30d mostraron una tendencia hacia la diferenciación ($p = 0.055$), aunque sin alcanzar significancia estricta. Estos resultados reflejan que, mientras la clorhexidina impacta de manera inmediata, las nanopartículas de cobre podrían estar generando efectos a largo plazo, modulando dinámicamente las comunidades bacterianas.

Tabla 12. Pruebas estadísticas PERMANOVA y pairwise PERMANOVA para la diversidad beta. Se presentan valores de F (estadístico F), R² (proporción de la varianza explicada por los tratamientos) y el p-valor asociado. Fuente: Elaboración propia.

Comparación	F	R ²	p-valor
CHX7d vs NG7d	0.97	0.139	0.285
CHX7d vs CONTROL	3.64	0.377	0.029
CHX7d vs NG30d	2.27	0.275	0.111
NG7d vs CONTROL	3.19	0.347	0.103
NG7d vs NG30d	2.78	0.317	0.055
CONTROL vs NG30d	2.18	0.266	0.131

6.6. Composición y estructura de la microbiota oral

El análisis de la composición taxonómica de la microbiota oral en los grupos experimentales (Control, CHX7d, NG7d y NG30d) mostró diferencias relevantes en la estructura y abundancia relativa de los taxones bacterianos a diversos niveles taxonómicos, desde filo hasta especie (**Figuras 22-31**). Es entonces, que en consistencia con los análisis tanto de diversidad alfa como beta los resultados relacionados a composición destacan los efectos específicos de los tratamientos sobre la microbiota oral, permitiendo identificar patrones microbiológicos característicos asociados a cada grupo de estudio.

6.6.1. Comparación general entre grupos

A nivel de phylum (Fig. 22 A), *Pseudomonadota* fue dominante en todos los grupos, alcanzando su mayor representación en los tratados con NPCu.

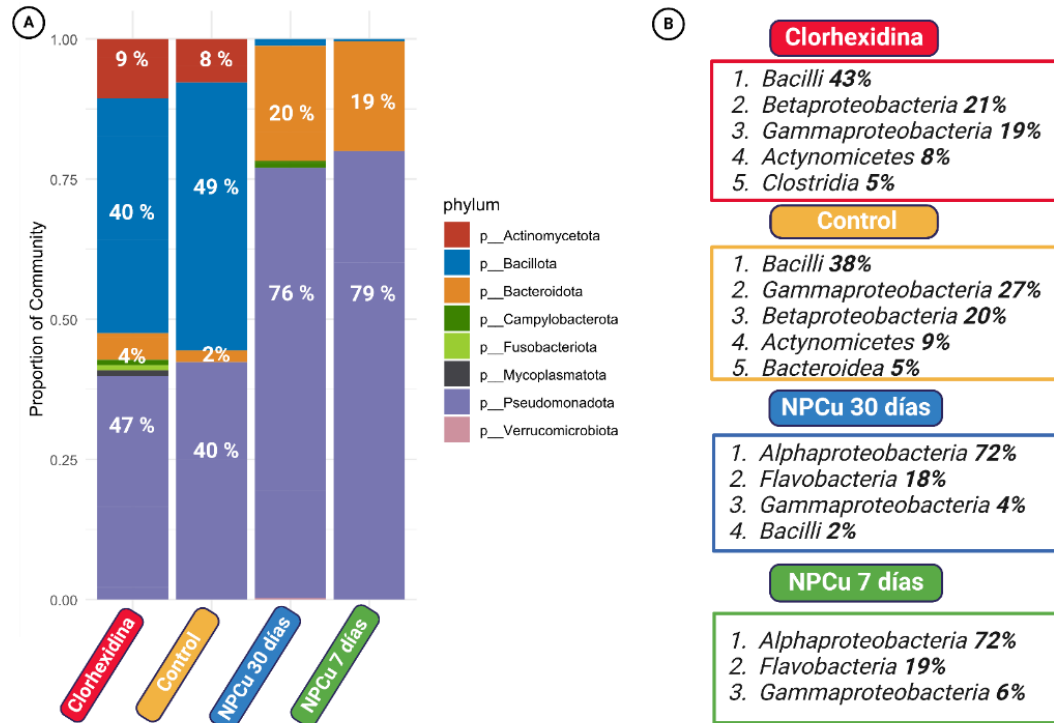


Figura 22. Composición taxonómica a nivel de phylum y clase en los diferentes grupos de estudio. (A) Distribución de los phyla bacterianos por grupos. (B) Distribución de las principales clases bacterianas en cada grupo. Fuente: Elaboración propia.

En la **Figura 22 B**, se muestran las principales clases, donde los grupos tratados con NPCu (NG7d y NG30d) presentan un predominio de *Alphaproteobacteria* (72%), seguido de *Flavobacteria* y *Gammaproteobacteria*. En el grupo CHX7d,

predominan *Bacilli* (43 %), *Betaproteobacteria* (21%) y *Gamaproteobacteria* (19%), mientras que en el grupo control se observa una mayor diversidad compuesta principalmente por *Bacilli* (38%), *Gammaproteobacteria* (27%), *Betaproteobacteria* (20%), *Actynomicetes* (9%) y *Clostridia* (5%).

En el grupo control, la microbiota presentó una mayor diversidad relativa, con *Bacillota* (49%) y *Pseudomonadota* (40%) como los phyla predominantes, seguidos por *Actinomycetota* (8%) y *Bacteroidota* (2%). Este perfil refleja una composición bacteriana relativamente equilibrada en ausencia de tratamientos antimicrobianos.



Figura 23. Gráfico circular que representa la composición taxonómica de la microbiota oral del grupo control. Se muestran proporciones a nivel de *phylum*, clase, orden, familia y género. Fuente: Elaboración propia.



Figura 24. Gráfico circular que representa la composición taxonómica de la microbiota oral del grupo CHX7d. Se muestran proporciones a nivel de *phylum*, clase, orden, familia y género. Fuente: Elaboración propia.

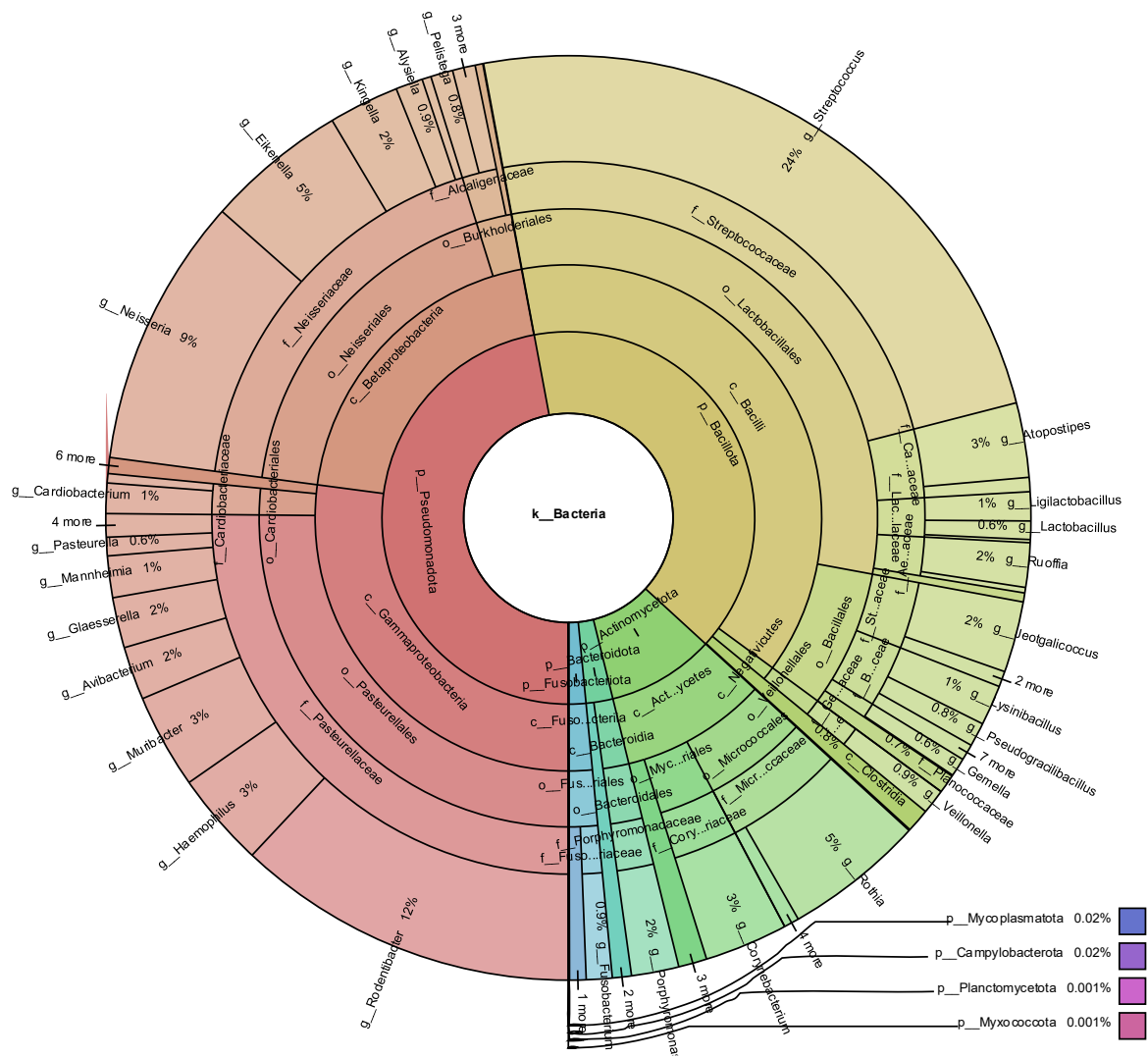


Figura 25. Gráfico circular que representa la composición taxonómica de la microbiota oral del grupo NG7d. Se muestran proporciones a nivel de *phylum*, clase, orden, familia y género. Fuente: Elaboración propia.



Figura 26. Pie chart que representa la distribución taxonómica de la microbiota oral del grupo NG30d. Se muestran proporciones a nivel de *phylum*, clase, orden, familia y género. Fuente: Elaboración propia.

En cuanto al grupo tratado con clorhexidina al 2% durante 7 días (CHX7d) se evidenció un aumento de *Pseudomonadota* (47%) y *Actinomycetota* (9%) a la vez que exhibió una disminución de *Bacillota* (40%) (**Figuras 22 A y 24**). Mientras tanto, los grupos tratados con NPCu evidenciaron una transición hacia comunidades dominadas por *Pseudomonadota*, que alcanzó el 79% en NG7d y el 76% en NG30d (**Figuras 22 A, 25 y 26**). Todos cambios sugieren efectos antimicrobianos selectivos tanto de CHX como de NPCu, cada uno modulando de manera distinta la estructura microbiana.

Los resultados a nivel de phylum, evaluados tanto por grupos de tratamiento como de manera individual para cada muestra, son consistentes en términos generales. Sin embargo, tal como se observa en la **Figura 27**, la muestra R3CHX7d destaca por presentar una proporción considerablemente mayor del phylum *Mycoplasmata*, siendo única en este aspecto dentro de su grupo. Asimismo, las muestras R1CHX7d y R4CHX7d son las únicas del grupo CHX7d que exhiben una proporción distintiva del phylum *Fusobacteriota*, lo que resalta variaciones específicas dentro del mismo tratamiento.

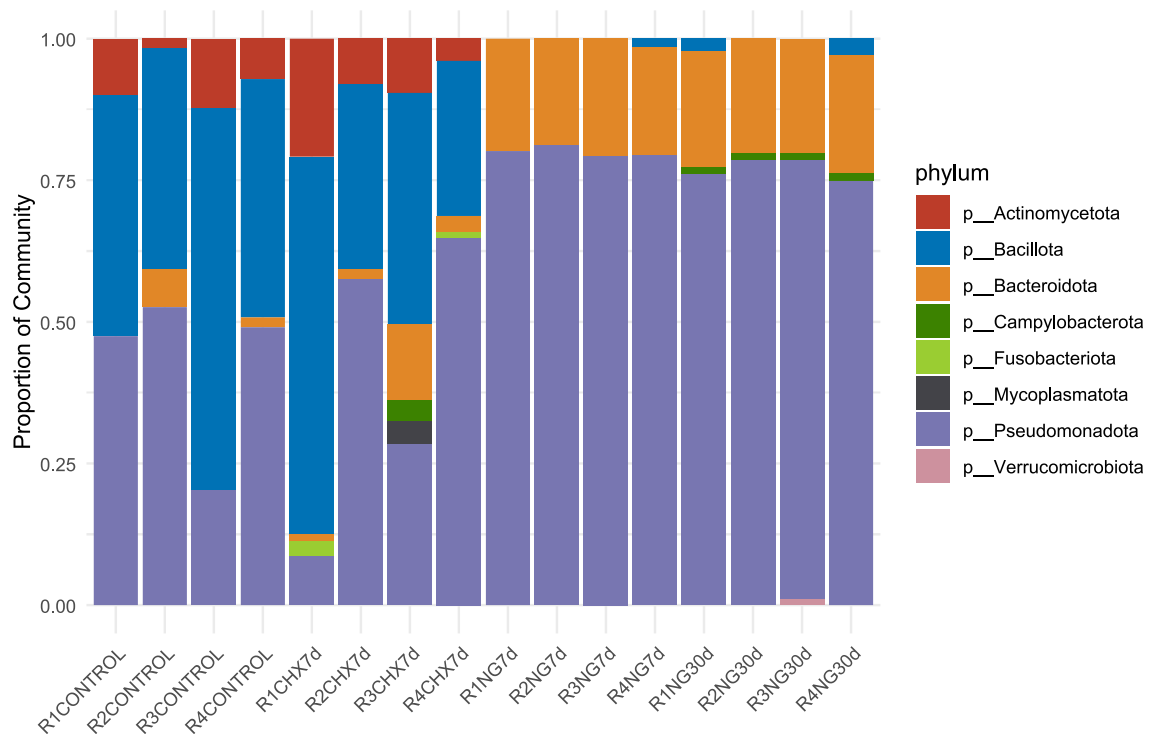


Figura 27. Distribución de los phyla bacterianos por muestras individuales. Fuente: Elaboración propia.

6.6.2. Variaciones en familias y géneros bacterianos

A nivel de familias bacterianas destacan patrones específicos en respuesta a los tratamientos (**Figura 28**). En el grupo control, las familias *Streptococcaceae* (25%) perteneciente al phylum *Bacillota*, *Neisseriaceae* (19%) perteneciente al phylum *Pseudomonadota* al igual que *Pasteurellaceae* (17%) fueron predominantes, reflejando una microbiota más diversa y equilibrada. Mientras tanto, en el grupo CHX7d las familias más abundantes fueron *Pasteurellaceae* (25%), *Streptococcaceae* (24%) y *Neisseriaceae* (18%). El grupo tratado con

NPCu por 7 días (NG7d) presentó un predominio de *Roseobacteraceae* (42%) perteneciente al phylum *Pseudomonadota* al igual que *Paracoccaceae* (30%) seguido de *Flavobacteriaceae* (17%) perteneciente a *Bacteroidota*. Esto último va en la misma línea del grupo tratado con NPCu por 30 días (NG30d) en el cual la familia más predominante fue *Roseobacteraceae* (43%) seguido de *Paracoccaceae* (28%) y *Flavobacteriaceae* (18%).

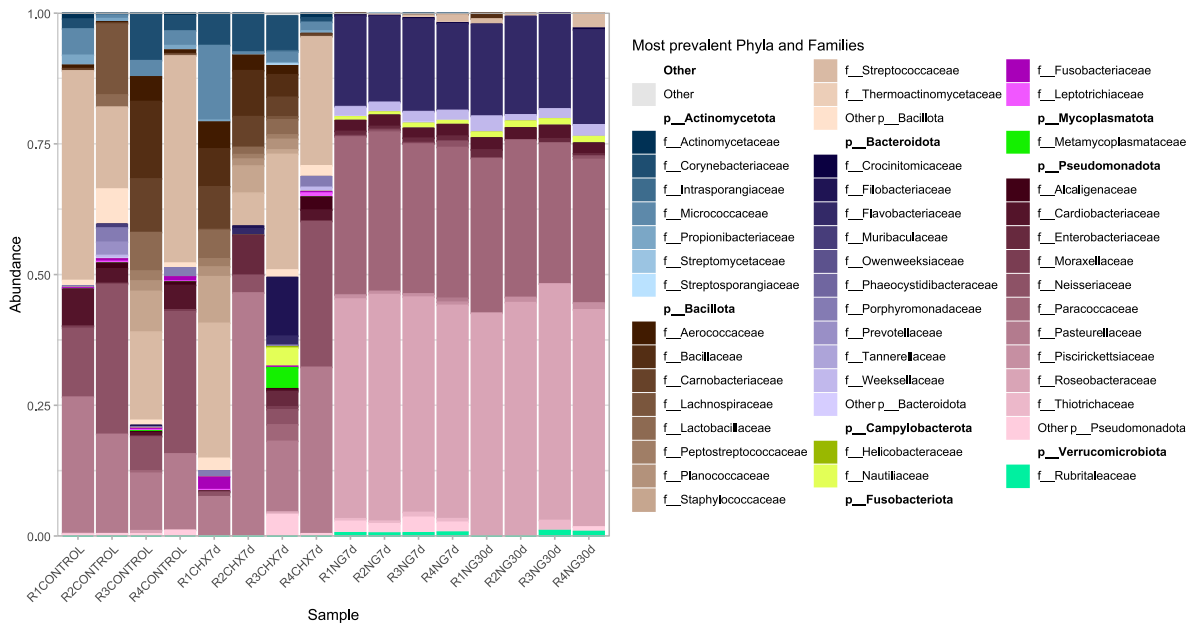


Figura 28. Distribución de la abundancia relativa de familias bacterianas más abundantes en la microbiota oral de cada individuo por grupo.

A nivel de género (**Figuras 23, 24, 25 y 26**), en el grupo control destaca la abundante presencia del género *Streptococcus* siendo un 27% de la composición total a nivel de géneros, seguido por *Neisseria* (12%), *Rodentibacter* (9%), *Eikenella* (4%) y *Corynebacterium* (4%). Mientras que en el grupo tratado con CHX los géneros más abundantes se reparten entre *Streptococcus* (24%), *Rodentibacter* (12%), *Neisseria* (9%), *Eikenella* (5%), *Rothia* (5%) seguido por géneros que ocupaban una menor proporción tales como *Corynebacterium* (3%), *Haemophilus* (3%), *Muribacter* (3%) y *Atopostipes* (3%). Cabe destacar que, en ambos grupos, es decir control y tratado con CHX, se detectó la presencia del género *Porphyromonas* e un 1% y 2% respectivamente. Llama la atención la ligera mayor abundancia observada en el grupo tratado con CHX que en el grupo control que no recibió tratamiento antiséptico.

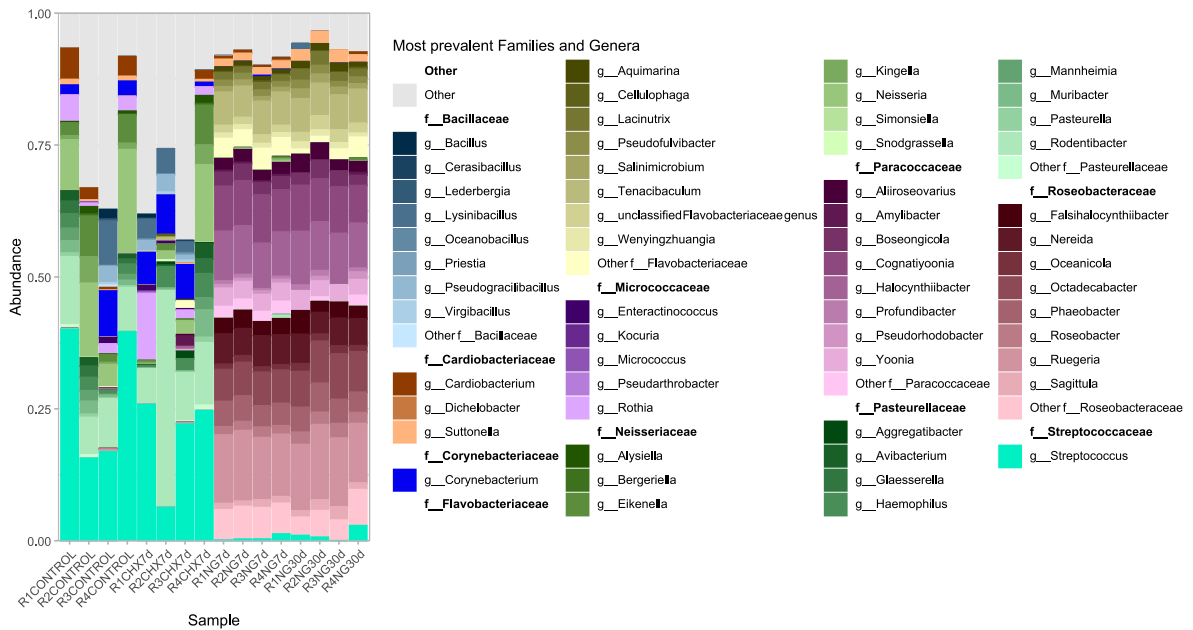


Figura 29. Distribución de la abundancia relativa de los géneros y phylum bacterianos más prevalentes en la microbiota oral de cada individuo por grupo. Fuente: Elaboración propia.

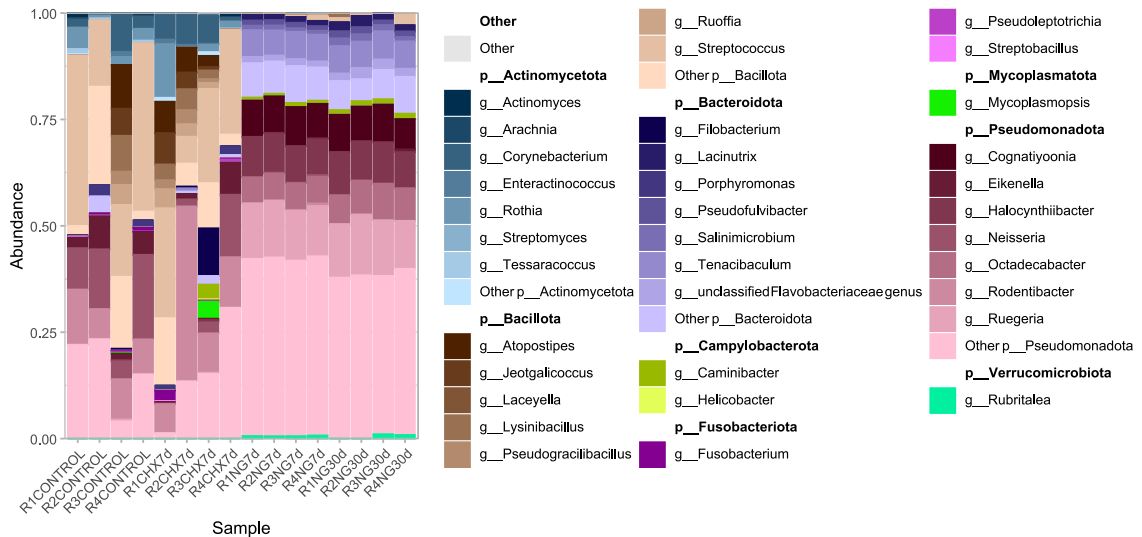


Figura 30. Distribución de la abundancia relativa de las familias y géneros bacterianos prevalentes en la microbiota oral de cada individuo. Fuente: Elaboración propia.

En contraste, al analizar la composición de los grupos tratados con NPCu a nivel de géneros, es posible destacar que ambos presentan abundancias relativamente similares, las cuales dan cuenta del marcado efecto antibacteriano de las NPCu sobre la microbiota oral dado que la estructura y composición se traslada de manera rotunda a la aparición de abundancias absolutamente distintas a lo que se puede apreciar en los grupos control y tratado con CHX, en este sentido el grupo NG7d exhibe una composición donde destaca el género *Ruegeria* (13%), *Halocynthiibacter* (9%), *Cognatiyoonia* (9%), *Tenacibaculum* (6%), *Octadecabacter* (6%), *Nereida* (6%), *Phaeobacter* (5%), seguidos por géneros que ocupan una menor proporción pero bien distribuida y que podría explicar la alta diversidad que se observaba anteriormente en los índices de Simpson y Shannon llegando a valores promedio relativamente similares a los

que presentaba el grupo control. De manera similar al grupo NG7d, el grupo NG30d presenta una composición liderada por el género *Ruegeria* (12%) seguida de *Halocynthiibacter* (9%), *Cognatiyoonia* (8%), *Octadecabacter* (8%), *Tenacibaculum* (6%), *Nereida* (5%), *Phaeobacter* (4%), *Falsihalocynthiibacter* (3%), *Yoonia* (3%), *Aliiroseovarius* (3%) y *Boseongicola* (3%).

6.6.3. Cambios a nivel de especies bacterianas

En base a la clasificación taxonómica proporcionada por Emu, basada en lecturas de longitud completa del gen 16S rRNA, se obtuvieron perfiles detallados de géneros y especies bacterianas, obteniendo una resolución más profunda en cuanto a jerarquía taxonómica.

Es importante destacar que la gran mayoría de las muestras muestran perfiles consistentes en cuanto a la distribución que se presenta a nivel de grupo. Abordando la composición detectada en los grupos NG7d y NG30d, estas en prácticamente la totalidad de las muestras destacan por una alta similitud entre cada una de las muestras individuales. Las especies que se presentan en mayor abundancia (**Figura 31.**) pertenecen a los géneros abordados anteriormente y en relación con ello es posible dar cuenta de *Ruegeria sp. AD91A*, *Halocynthiibacter namhaensis*, *Cognatiyoonia Koreensis*, *Octadecabacter temperatus*, *Tenacibaculum ovolyticum*, *Nereida ignava*, *Phaeobacter inhibens*,

Falsihalocynthiibacter articus, *Yoonia litorea*, *Aliiroseovarius lamellibrachiae* y *Boseongicola* sp. CCM32.

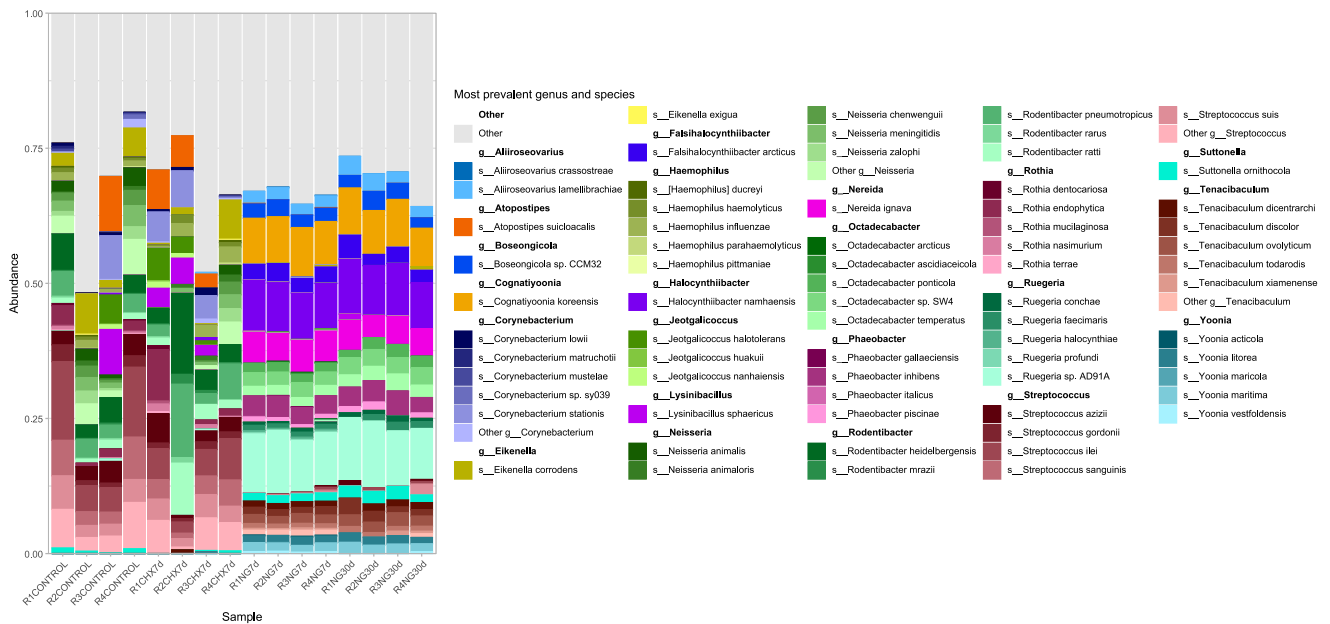


Figura 31. Distribución de la abundancia relativa de los géneros y especies bacterianas más prevalentes en la microbiota oral de los diferentes grupos de tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, en el grupo tratado con clorhexidina (CHX7d), se observaron altos niveles de abundancia relativa de *Atopostipes suicloacalis* y *Corynebacterium stationis*, pero presentó una composición similar a la del grupo control observándose una abundancia predominante de especies que se comparten entre ambos grupos tales como las del género *Streptococcus* donde destacan *S. ilei*, *S. sanguinis*, *S. gordonii* y *S. azizii*. Mientras tanto en estos grupos también destaca la presencia de *Rodentibacter heilderbergensis*, *Neisseria animalis*, y *Eikenella corrodens*. Cabe destacar la presencia de *Neisseria meningitidis* en

mayor proporción en las muestras de individuos tratados con CHX lo cual podría ser una señal de selección de patógenos oportunista luego de la utilización de este tratamiento antiséptico.

La **Figura 32** presenta un análisis integrador en base a diagramas de Venn que resaltan taxones compartidos entre los grupos, incluyendo 6 familias, 6 géneros y 8 especies bacterianas. Entre las familias compartidas, *Neisseriaceae* y *Streptococcaceae* son particularmente relevantes, dado su papel central en la estabilidad y funcionalidad de la microbiota oral. A nivel de género, *Streptococcus* y *Lysinibacillus* resaltan, mientras que, entre las especies compartidas, destacan *Eikenella corrodens* y *Streptococcus suis*. La identificación de géneros adicionales como *Suttonella* y *Cardiobacterium*, presentes en todos los grupos, apunta a su posible rol basal en la comunidad microbiana, proporcionando resiliencia frente a perturbaciones externas.

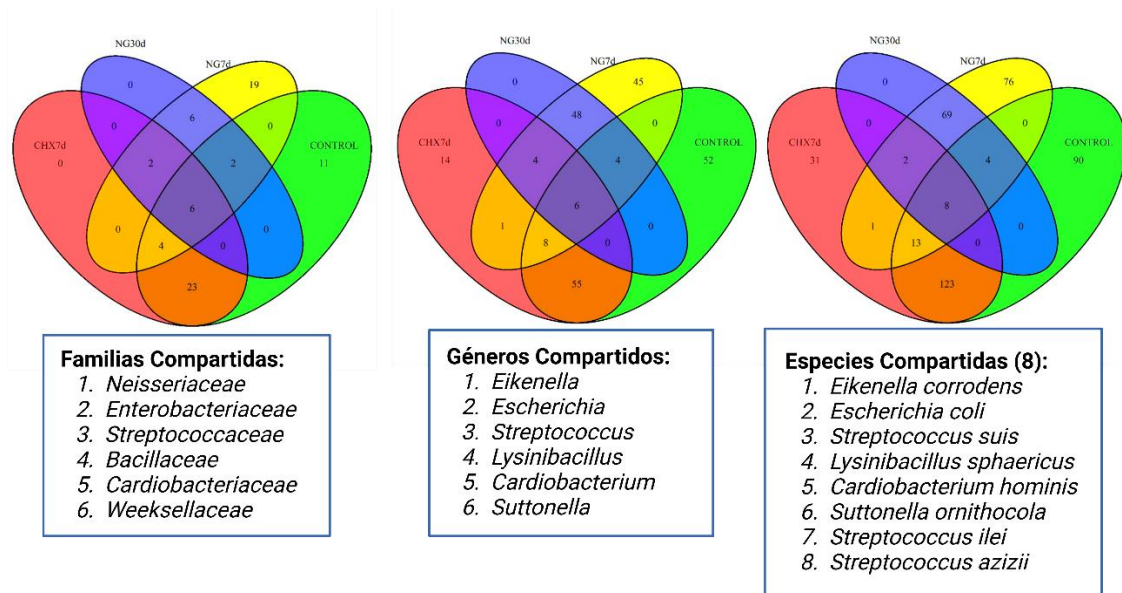


Figura 32. Diagramas de Venn que muestran la cantidad de familias, géneros y especies bacterianas compartidas entre los cuatro grupos de estudio. **A)** Familias compartidas (6). **B)** Géneros compartidos (6). **C)** Especies compartidas (8). Fuente: Elaboración propia.

En contraste, el grupo control presentó una composición más equilibrada, caracterizada por una mayor heterogeneidad de géneros como *Rodentibacter* y *Ruegeria*. Esto indica un estado ecológico menos alterado y posiblemente más representativo de la microbiota basal. Los patrones compartidos identificados en la **Figura 32** sugieren que ciertos taxones actúan como estabilizadores ecológicos, manteniendo la cohesión de la comunidad bacteriana incluso bajo condiciones de estrés.

Por otro lado, pero siguiendo la misma lógica del entendimiento de la composición y sobre todo de la estructura de la microbiota oral basal y alterada por los dos tratamientos tanto a 7 como a 30 días, las **Figuras 33, 34, 35 y 36** presentan distintas visualizaciones por medio de “heat map tree” o árboles taxonómicos de calor donde cada nodo representa un nivel taxonómico (desde reino hasta especie), con el grosor y el color de las ramas reflejando la abundancia relativa de los taxones observados por grupo. Así, en el árbol correspondiente al grupo control (**Figura 33.**) los colores varían de púrpura (mayor abundancia) a naranja (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (n_{obs}) asociadas a cada nodo. Dentro de las muestras control, se destacan los phyla *Bacillota* y *Pseudomonadota*. Las familias *Streptococcaceae* y *Neisseriaceae* emergen como dominantes, con géneros como *Streptococcus* siendo particularmente abundantes.

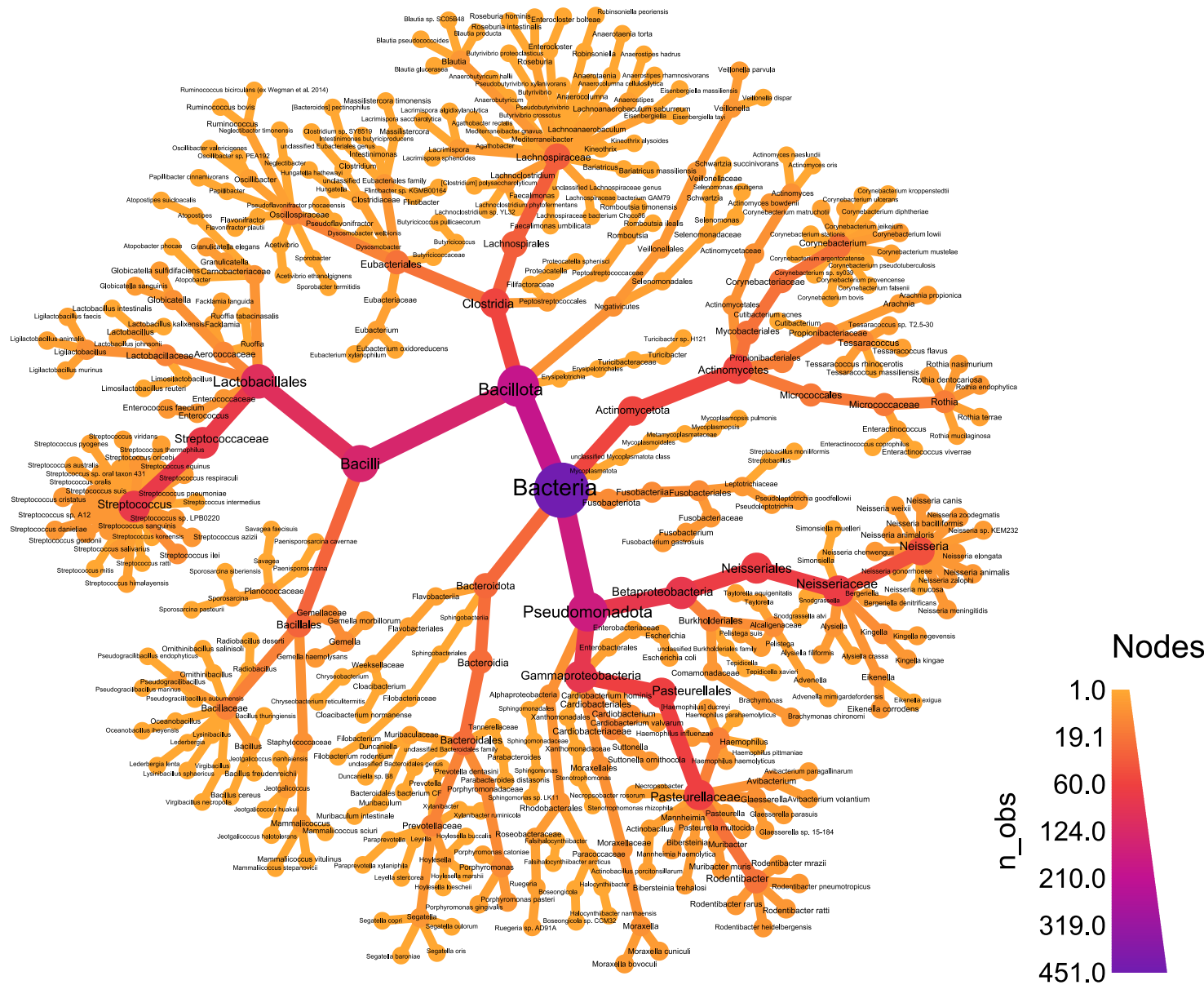


Figura 33. Heatmap tree de la composición taxonómica para el grupo control. Variación de colores desde púrpura (mayor abundancia) a naranja (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (n_{obs}) asociadas a cada nodo. Fuente: Elaboración propia.

Cabe destacar que, a nivel de especies, a pesar de tener una representación muy poco abundante *Porphyromonas gingivalis* aparece en la representación siendo parte del phylum *Bacteroidota*, lo cual da cuenta de que a pesar de ser una microbiota bastante disímil a la del ser humano, el modelo de rata expresa ciertas similitudes al menos en aspectos puntuales como lo es la aparición de este microorganismo.

Mientras tanto, para el grupo CHX7d (**Figura 34**), se observa una dominancia de los phyla *Bacillota* y *Pseudomonadota*, junto con órdenes como *Lactobacillales*, *Neisseriales* y *Pasteurellales*. Las familias más preponderantes incluyen *Streptococcaceae*, *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae*, con géneros tales como *Streptococcus*, *Rodentibacter*, *Eikenella* y *Neisseria*. Al igual que como ocurre en el grupo control, aparece también la especie *Porphyromonas gingivalis*, aunque en muy baja abundancia.

Por su parte en el grupo NG7d (**Figura 35**) el *phylum* predominante fue *Pseudomonadota*, seguido por *Bacteroidota* y *Bacillota*, destacando géneros de la familia *Paracoccaceae* tales como *Yoonia*, *Cognatiyoonia* y *Halocynthiibacter*, además de géneros pertenecientes a la familia *Flavobacteriaceae* del filo *Bacteroidota*, tales como *Tenacibaculum* y *Lacinutrix*. A su vez, el phylum *Bacillota* destaca por la detección de géneros de la familia *Streptococcaceae*, aunque en mucha menor proporción que en los grupos control y CHX7d, específicamente *S. sanguinis*, *S. suis*, *S. gordonii*, *S. ilei* y *S. azizii*.

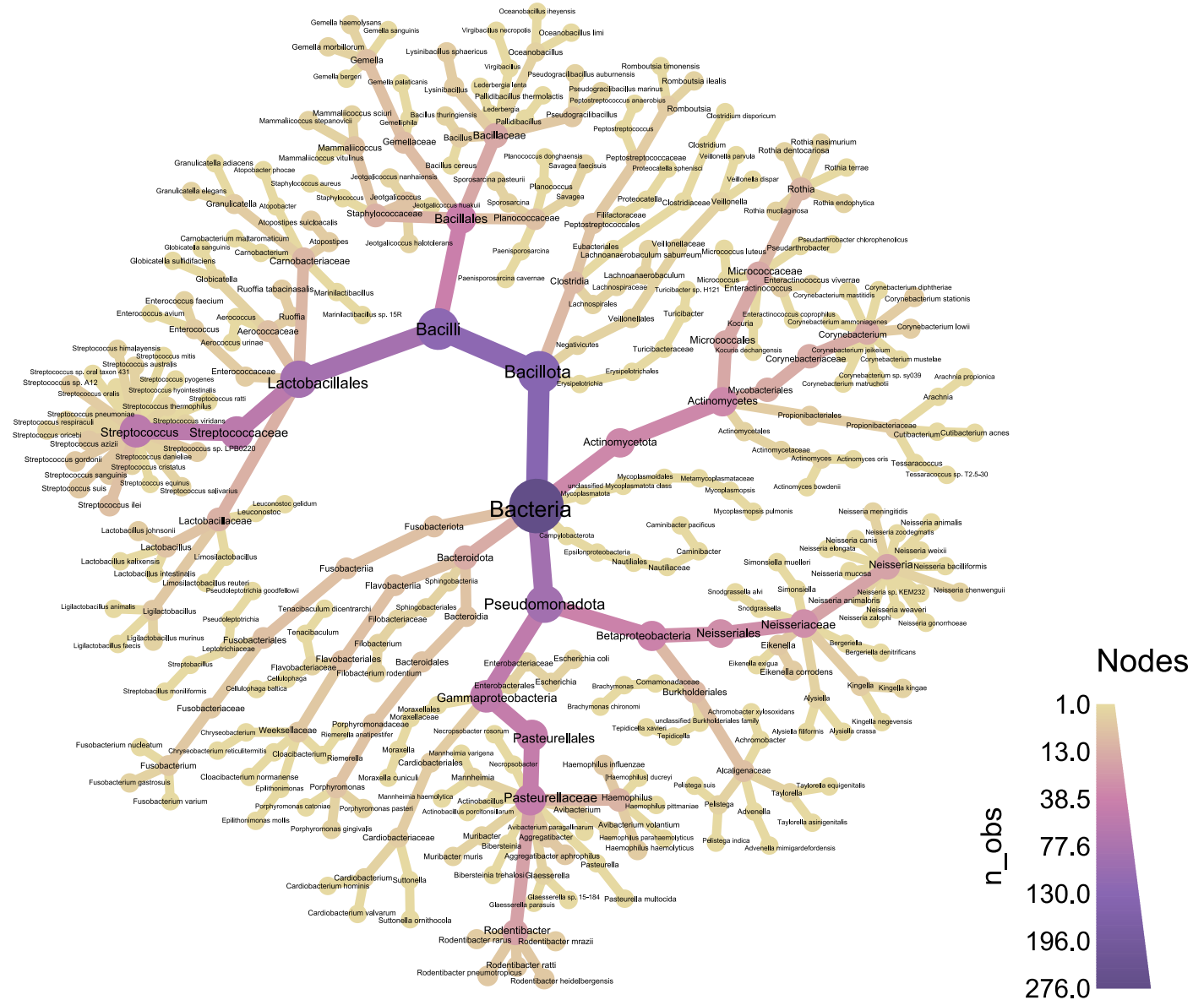


Figura 34. Heatmap tree para el grupo CHX7d. Variación de colores desde púrpura (mayor abundancia) a amarillo (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (n_obs) asociadas a cada nodo. Fuente: Elaboración propia.

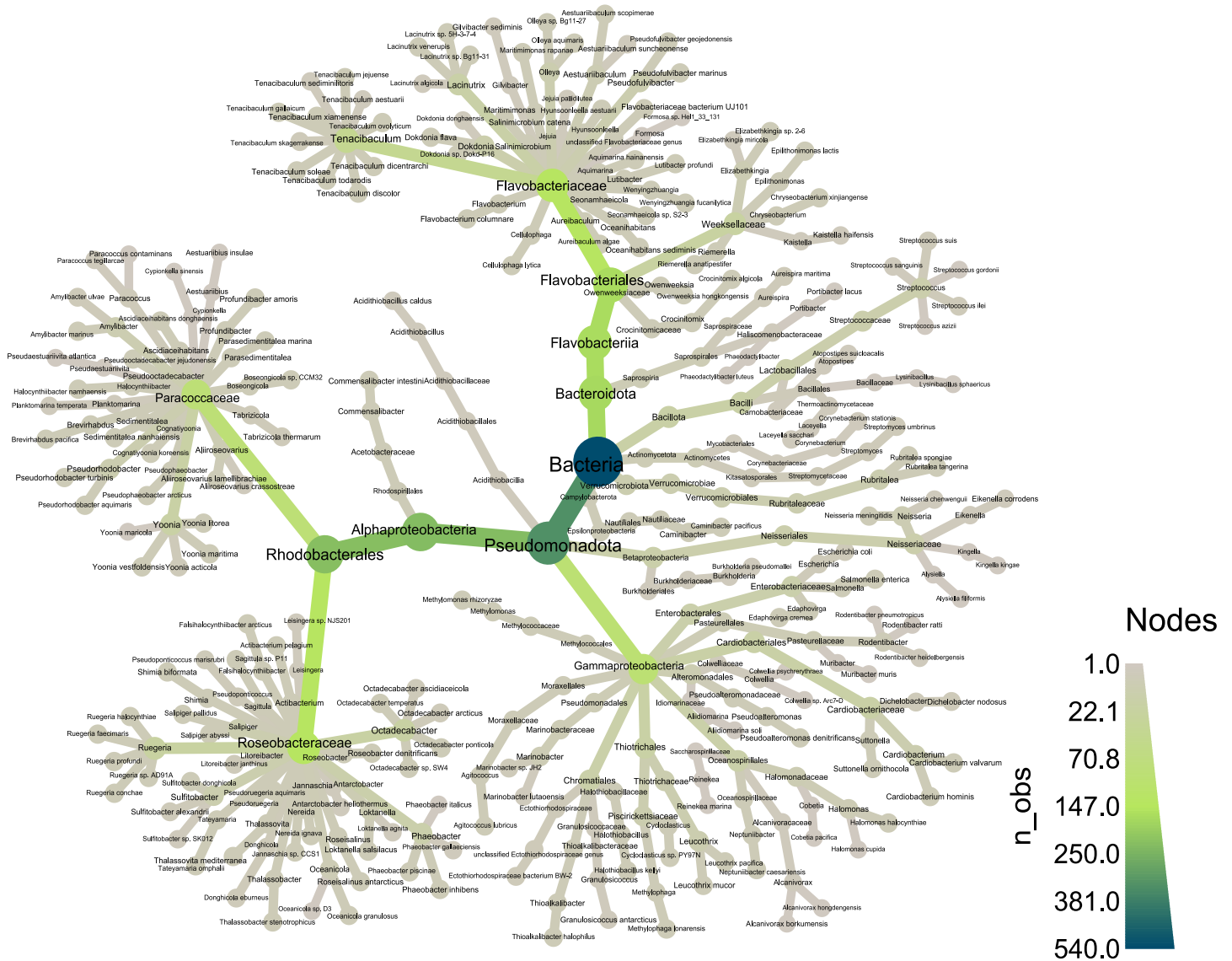


Figura 35. Heatmap tree para el grupo (NG7d). Variación de colores desde verde oscuro (mayor abundancia) a amarillo y gris (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (n_{obs}) asociadas a cada nodo. Fuente: Elaboración propia.

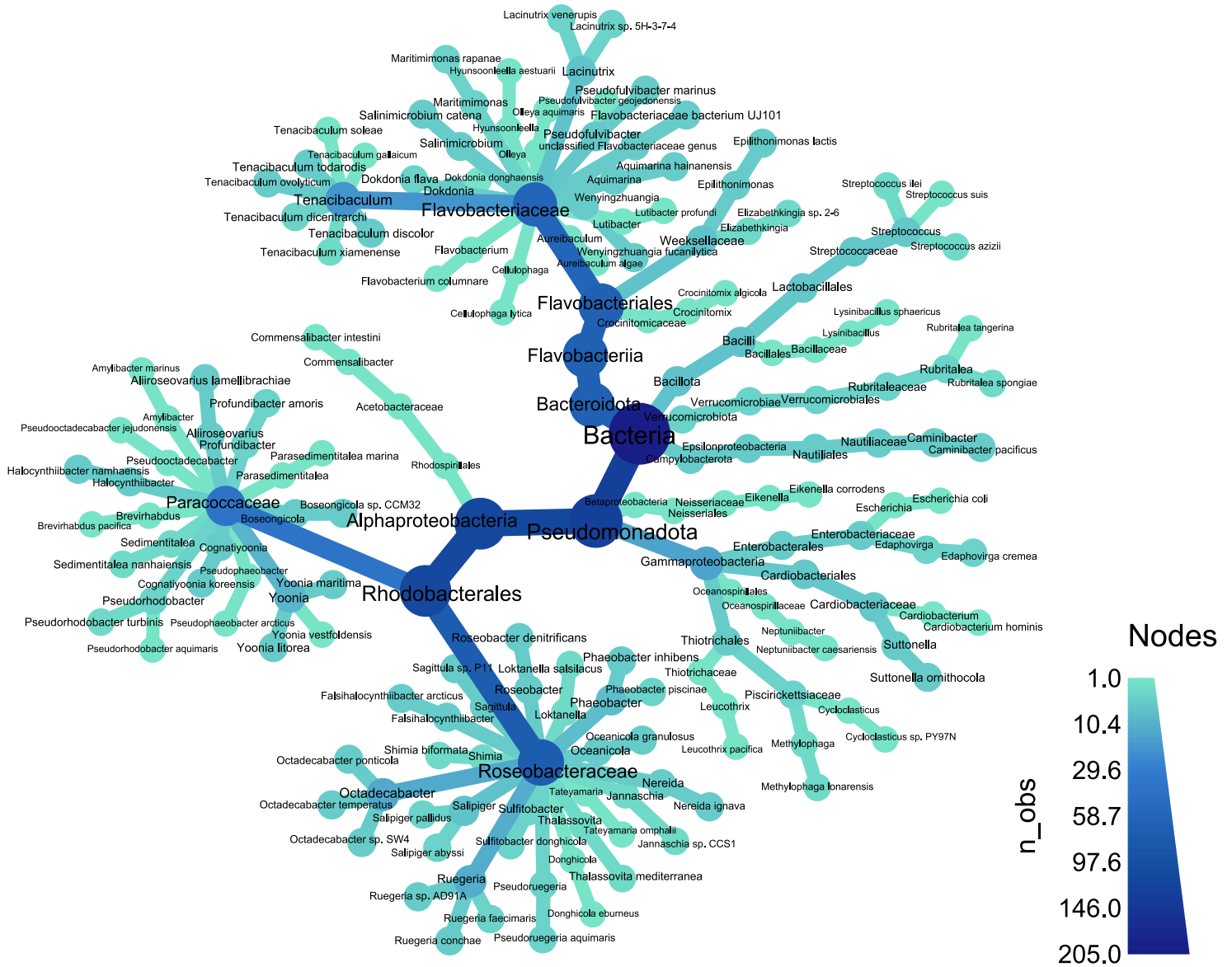


Figura 36. Heatmap tree para el grupo (NG30d). Variación de colores desde azul oscuro (mayor abundancia) a verde agua (menor abundancia), según la cantidad de observaciones (n_{obs}) asociadas a cada nodo. Fuente: Elaboración propia.

El grupo NG30d (**Fig. 36**) presenta una composición bastante similar en términos generales al grupo tratado con CuNP por 7 días. Sin embargo, se evidencian diferencias relevantes en cuanto a la riqueza taxonómica a nivel de género y especie. Por ejemplo, en el grupo NG30d se observa la desaparición del género *Neisseria*, que estuvo presente en el tratamiento por 7 días, manteniéndose solamente *Eikenella* como representante de la familia *Neisseriaceae*. De forma similar, algunas familias pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*, como Pasteurellaceae, también están ausentes en este grupo. Asimismo, se observa la desaparición de órdenes completos que estaban presentes en el tratamiento de 7 días, tales como *Alteromonadales*, *Chromatiales*, *Pseudomonadales*, *Moraxellales* y *Methylococcales*. Estos cambios sugieren una reorganización taxonómica profunda inducida por la exposición prolongada a las NPCu.

6.7. Análisis de vías metabólicas funcionales predictivas

Se evaluaron las vías metabólicas funcionales predictivas presentes en todas las muestras utilizando la herramienta PICRUST2 en combinación con la base de datos MetaCyc, identificando un total de 376 vías metabólicas. De estas, 51 vías fueron clasificadas dentro del nivel funcional 2 (sec level pathways), y tras su análisis estadístico comparando múltiples grupos, 23 vías metabólicas mostraron actividad significativa en términos comparativos.

Dentro de las 23 vías metabólicas funcionales activas, se incluyen rutas clave como la biosíntesis y degradación de aminoácidos, carga de aminoacyl-tRNA,

biosíntesis y degradación de compuestos aromáticos, degradación de carbohidratos, degradación de carboxilatos, biosíntesis de estructuras celulares, degradación de compuestos clorados, asimilación de otros compuestos (Degradación/utilización/asimilación-otras), la vía de ethylmalonyl-CoA, fermentación, biosíntesis de glucanos, glicólisis, ciclo del glioxilato, metabolismo de nutrientes inorgánicos, biosíntesis y degradación de nucleósidos y nucleótidos, degradación de compuestos poliméricos, respiración, biosíntesis y degradación de metabolitos secundarios, y la super ruta de biosíntesis de histidina, purinas y pirimidinas.

El análisis de componentes principales (PCA) permite visualizar las diferencias en la actividad metabólica de las microbiotas entre los grupos experimentales (**Figura 37**). El gráfico evidencia una clara separación entre los tratamientos con NPCu (NG7d y NG30d), CHX (CHX7d) y el grupo control.

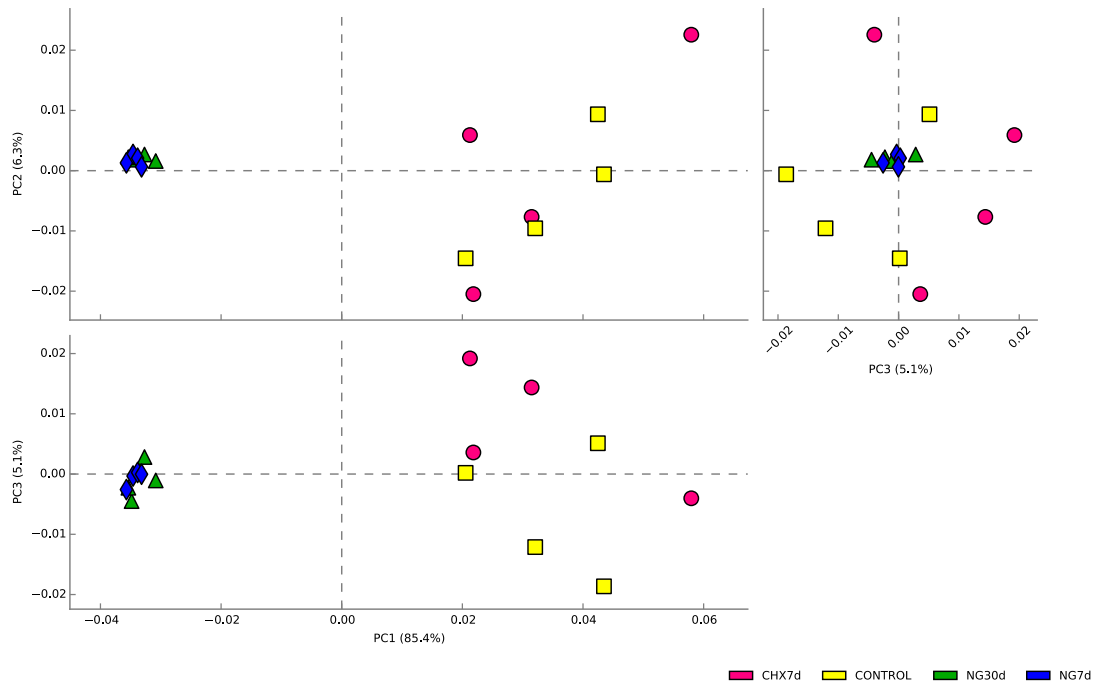


Figura 37. Representación gráfica del análisis funcional de vías metabólicas por grupo mediante PCA. Fuente: Elaboración propia.

Al analizar las diferencias en las vías metabólicas funcionales de nivel 2 (sec level) entre los grupos tratados con CHX7d (rosa/rojo) y NG7d (azul), se observan variaciones significativas en las proporciones medias de las vías metabólicas, evaluadas mediante la prueba t de Welch con intervalos de confianza al 95%. Además, se fijó un tamaño del efecto de 0.8, lo que permite destacar aquellas vías metabólicas cuya abundancia relativa presenta valores sobresalientes.

En la **Figura 38**, se comparan las vías metabólicas más relevantes entre ambos grupos. Los resultados resaltan diferencias específicas en vías como la biosíntesis de nucleósidos y nucleótidos, que predomina en el grupo CHX7d, y la biosíntesis de aminoácidos, significativamente más abundante en NG7d. Así mismo, la vía relacionada al metabolismo de nutrientes inorgánicos en la cual se encuentra englobada además la vía de reducción de nitrato a nitrito, se ve más activa en el grupo NG7d.

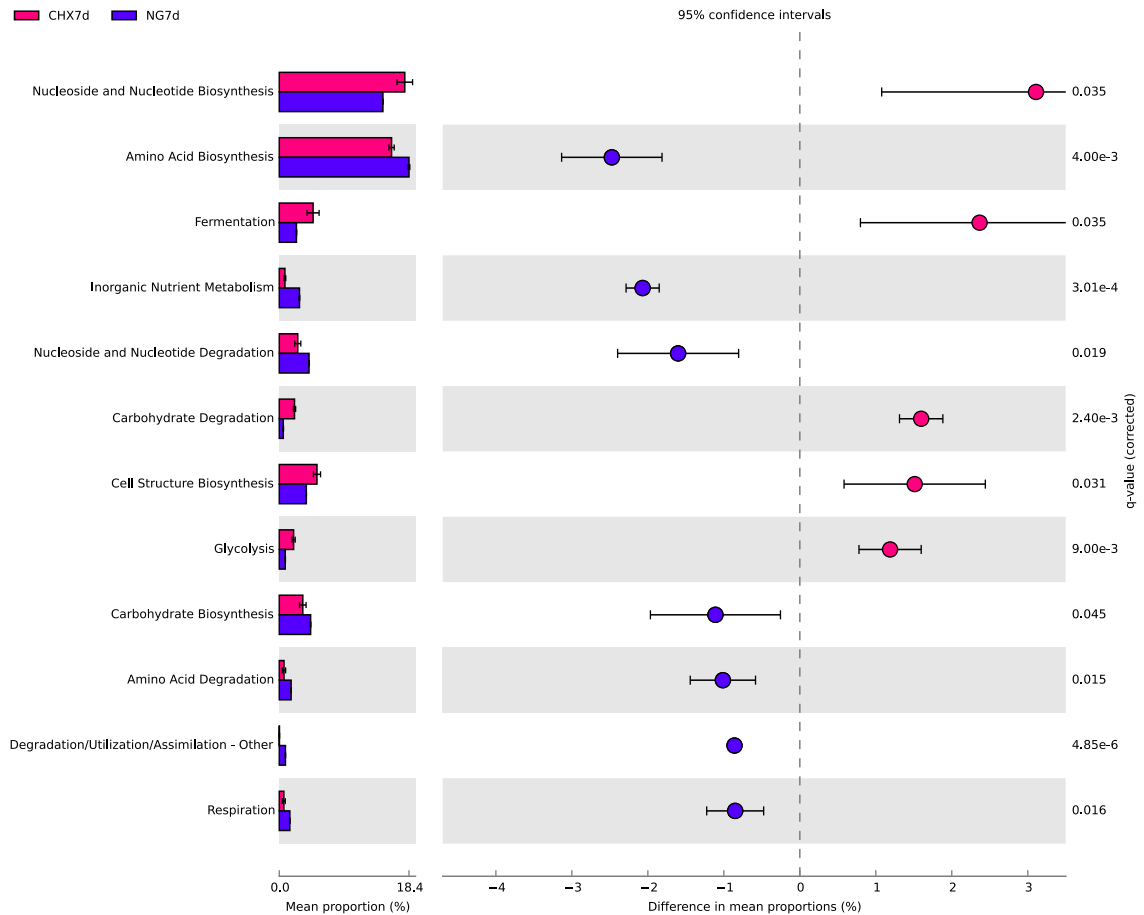


Figura 38. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos CHX7d y NG7d. Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, vías tales como fermentación, glicólisis, biosíntesis de estructuras celulares y degradación de carbohidratos, se ven mayoritariamente más expresadas en el grupo CHX7d, mientras que vías relacionadas a respiración, degradación/utilización/asimilación, degradación de aminoácidos y síntesis de carbohidratos resaltan en el grupo NG7d.

Al comparar las vías metabólicas de nivel 2 entre los grupos CHX7d y NG30d (**Figura 39**), se observan diferencias significativas en las proporciones medias de las rutas metabólicas.

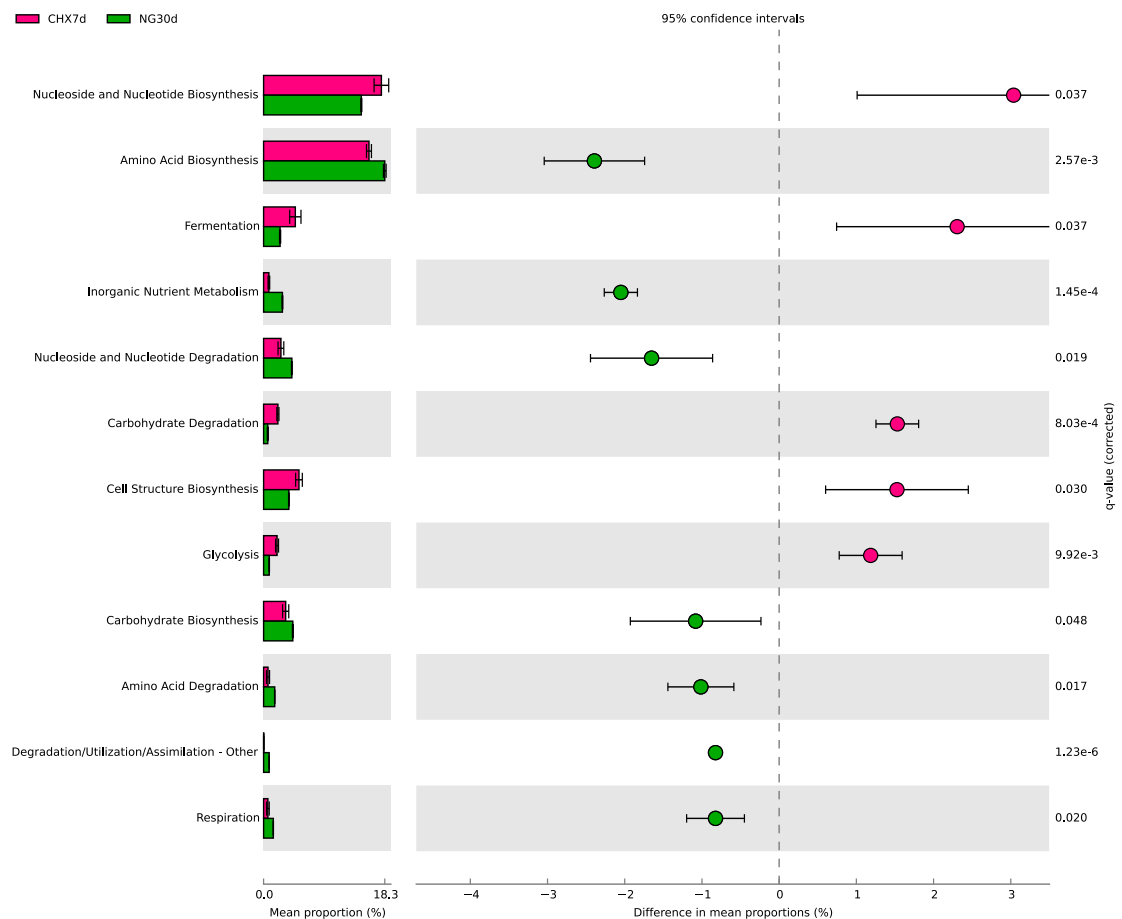


Figura 39. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos CHX7d y NG30d. Fuente: Elaboración propia.

El grupo CHX7d muestra una mayor actividad en vías como la biosíntesis de nucleósidos y nucleótidos, fermentación, degradación de carbohidratos, biosíntesis de estructuras celulares y glicólisis, lo que podría reflejar un enfoque

metabólico dirigido hacia el mantenimiento energético y estructural en respuesta al tratamiento con clorhexidina.

Por otro lado, el grupo NG30d evidencia una mayor expresión en vías como la biosíntesis de aminoácidos, metabolismo de nutrientes inorgánicos, degradación de nucleósidos y nucleótidos, biosíntesis de carbohidratos, degradación de aminoácidos y respiración, lo que sugiere un perfil metabólico más diversificado y anabólico, posiblemente asociado con la influencia prolongada de las nanopartículas de cobre. Las observaciones anteriormente realizadas son consistentes con los resultados obtenidos al comparar el grupo tratado con NPCu durante 7 días.

Respecto a las comparaciones de las vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos Control y NG7d (**Figura 40**) y entre Control y NG30d (**Figura 41**), se observan patrones metabólicos diferenciados en respuesta a los tratamientos.

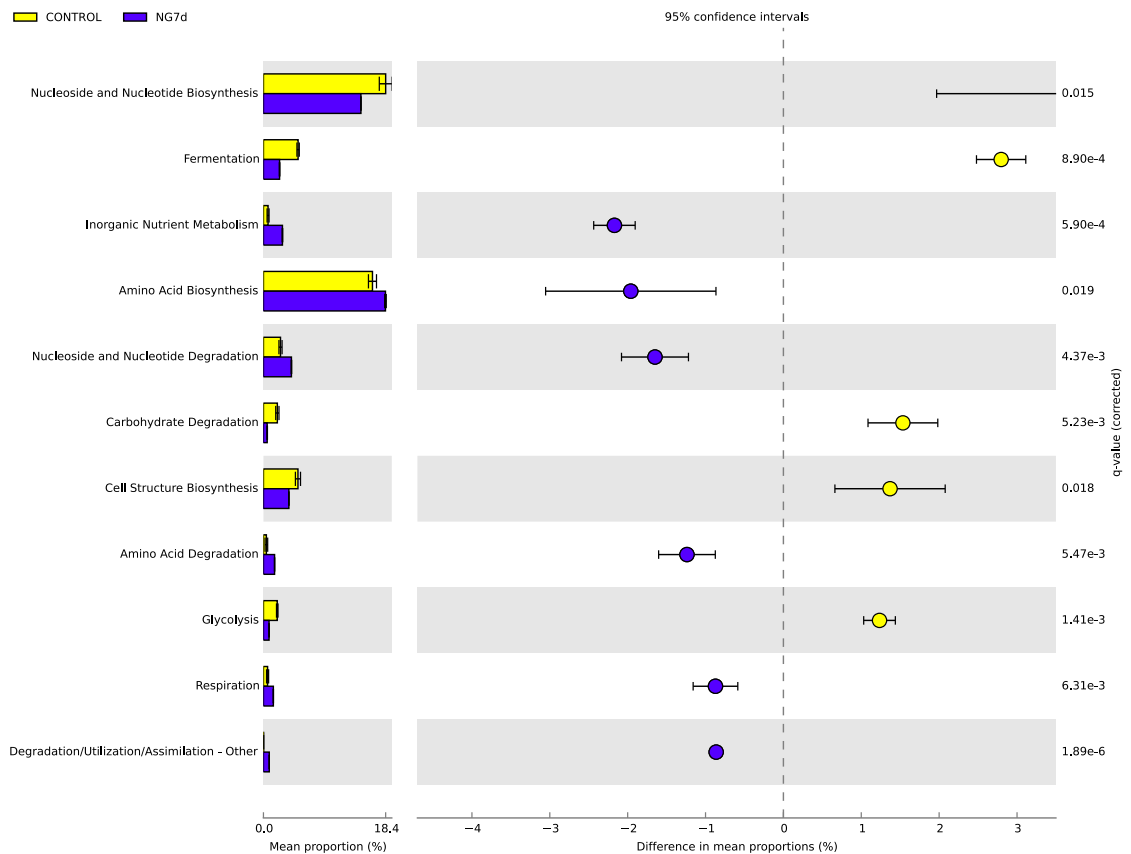


Figura 40. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos Control y NG7d. Fuente: Elaboración propia.

En la **Figura 40**, El grupo NG7d destaca por una mayor actividad en vías como la biosíntesis de aminoácidos, el metabolismo de nutrientes inorgánicos y la degradación de nucleósidos y nucleótidos, lo que sugiere un perfil metabólico orientado hacia el anabolismo y la adaptación a las condiciones generadas por las nanopartículas de cobre. Por otro lado, el grupo control presenta una mayor proporción en vías relacionadas con la fermentación, glicólisis y biosíntesis de estructuras celulares.

De manera similar, en la **Figura 41**, se destacan diferencias significativas entre los grupos control y NG30d.

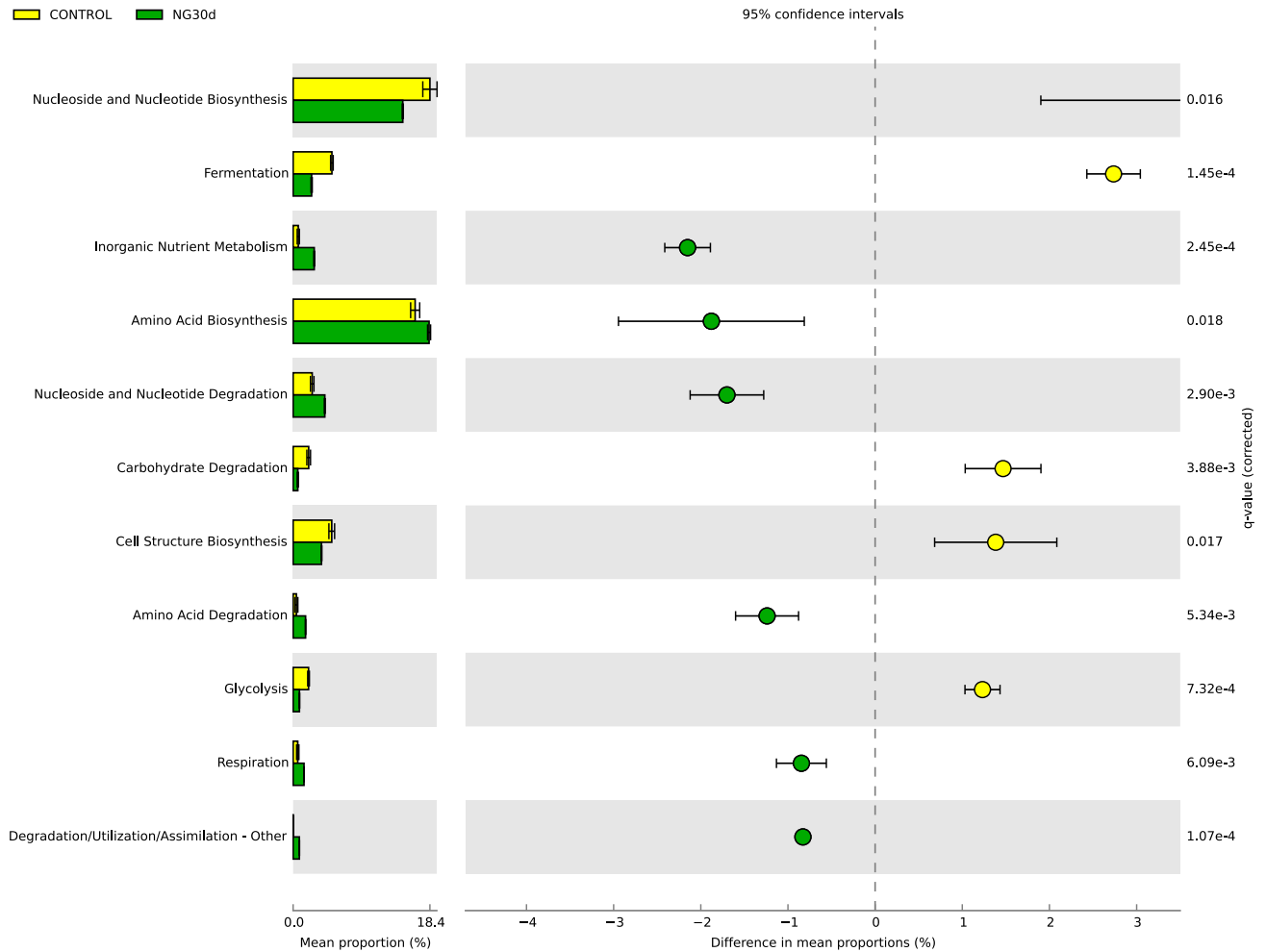


Figura 41. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 2 entre los grupos Control y NG30d.

El grupo control presenta una mayor actividad en vías como la biosíntesis de nucleótidos, pero sin ser diferencia estadísticamente significativa. Mientras tanto, las vías asociadas a fermentación, glicólisis, biosíntesis de estructuras celulares

y degradación de carbohidratos si resultaron ser estadísticamente significativas y mayormente expresadas en el grupo control. Por el contrario, el grupo NG30d evidencia una mayor proporción en vías relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos, la respiración y la degradación de aminoácidos, nucleótidos y nucleósidos además del metabolismo de nutrientes inorgánicos, de manera similar al caso de lo ocurrido en el grupo NG7d.

Al analizar las vías metabólicas a nivel descriptivo o también denominadas vías metabólicas predictivas de nivel 3 es posible dar cuenta de 130 vías funcionales que muestran significancia estadística entre todos los grupos. Al momento de realizar comparaciones entre grupos se pueden reflejar estas diferencias de acuerdo con lo mostrado en la **Figura 41** donde se comparan las diferencias entre las medias de los grupos CHX7d y NG7d, mientras que en la **Figura 42** se comparan los grupos CHX7d y NG30d.

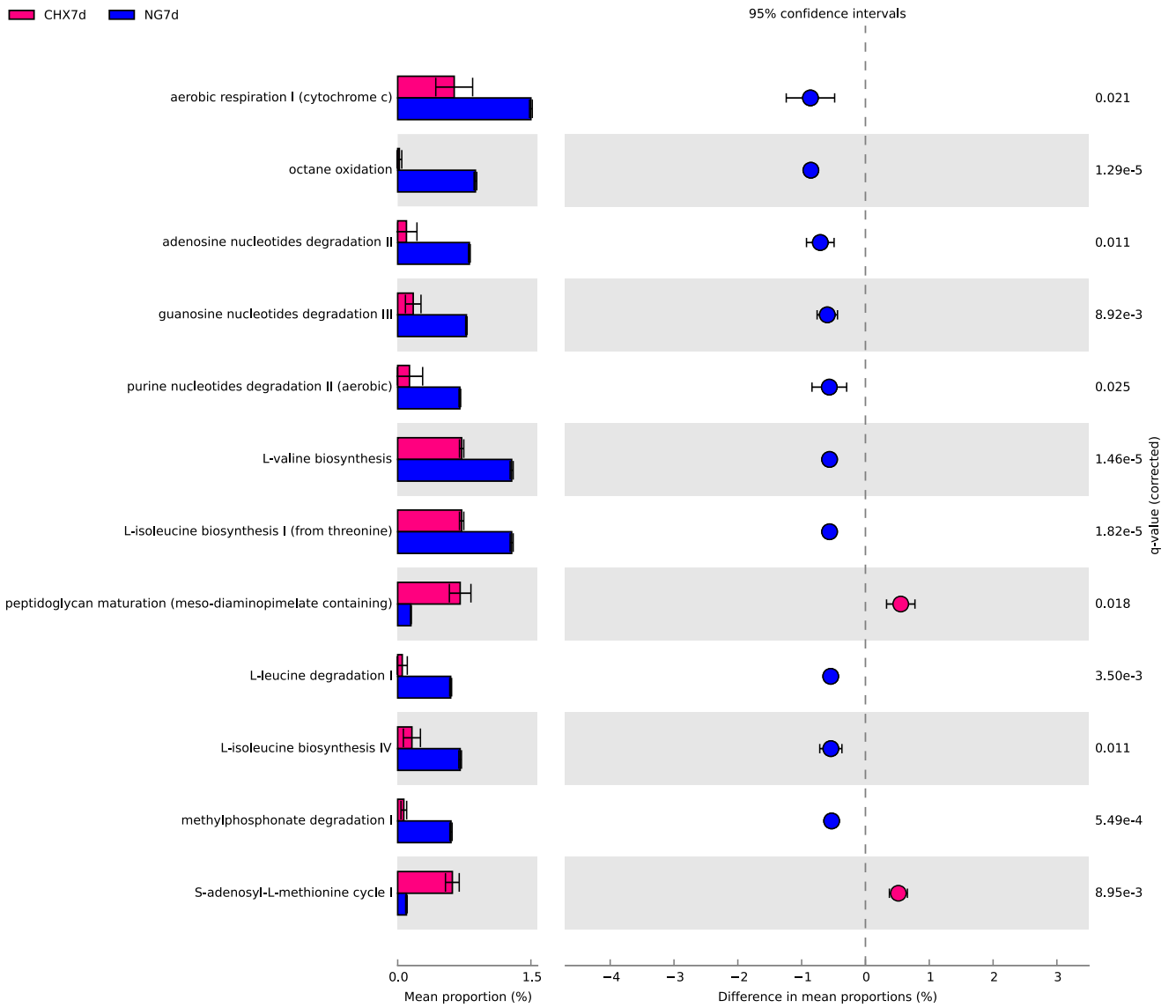


Figura 42. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 3 entre los grupos CHX7d y NG7d. Fuente: Elaboración propia.

En ambos casos se evidencia que ambos tratamientos con NPCu potencian rutas tales como las vías metabólicas relacionadas a la respiración aeróbica I, la oxidación de octano, la degradación de nucleótidos de adenosina, guanosina y

purina, además del metabolismo de aminoácidos. Mientras tanto, el grupo tratado con CHX presenta una mayor expresión de vías relacionadas con la maduración de peptidoglucano y el ciclo I de S-adenosil-L-metionina.

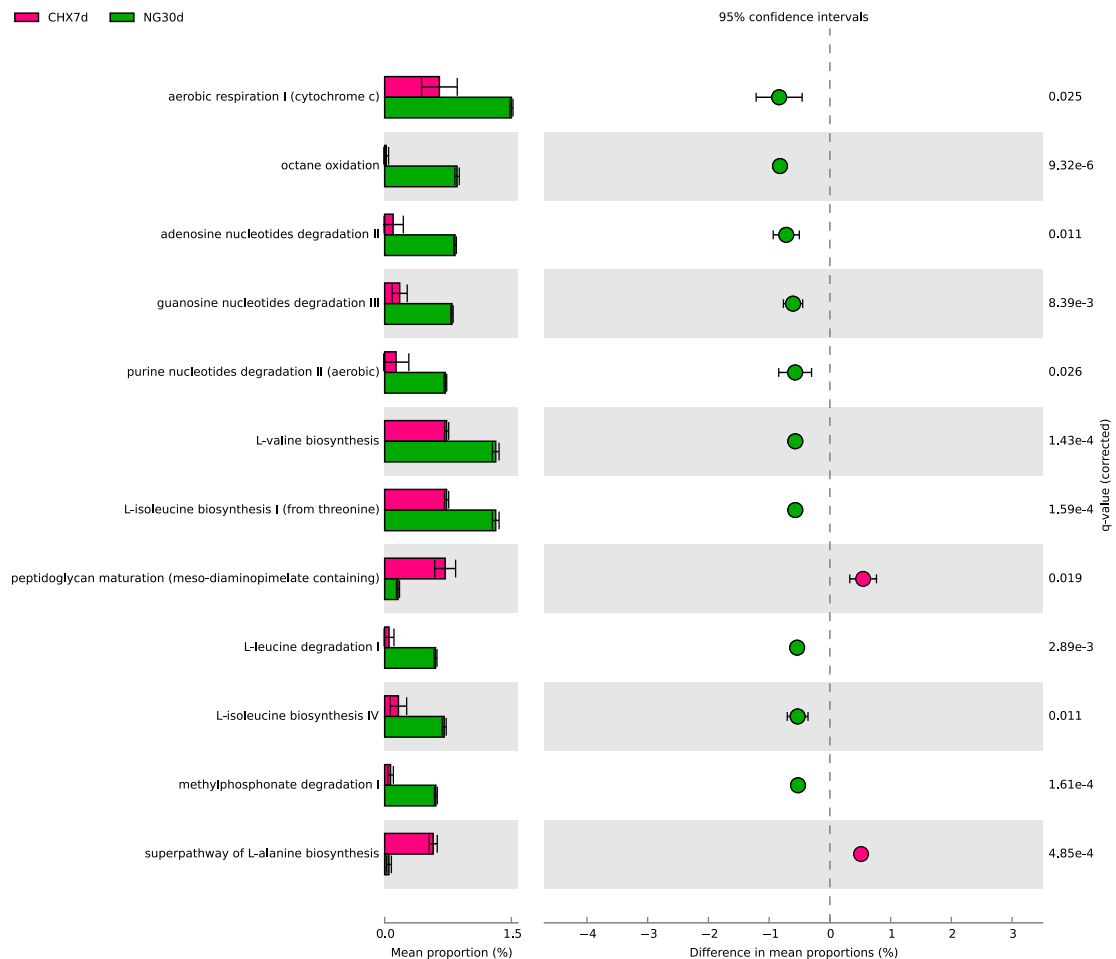


Figura 43. Comparación de las proporciones medias de vías metabólicas funcionales de nivel 3 entre los grupos CHX7d y NG30d. Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, es relevante destacar la vía de reducción de nitrato a nitrito, la cual, aunque no mostró un tamaño del efecto marcado (>0.8), presentó

diferencias estadísticamente significativas, siendo más activa en los grupos NG7d y NG30d. En la **Figura 43** se evidencian estas diferencias mediante la representación de las proporciones medias entre los grupos, mientras que la **Figura 44** ilustra de manera detallada la estructura y componentes de esta vía metabólica según la base de datos MetaCyc.(Caspi et al., 2020b)

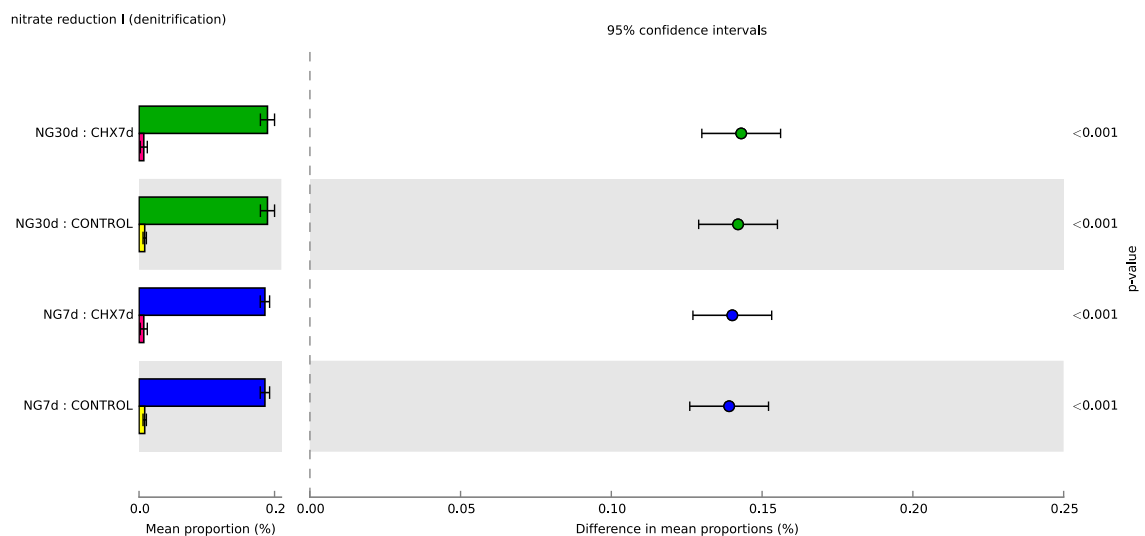


Figura 44. Comparación de la proporción media de la vía de reducción de nitrato a nitrito entre los grupos experimentales. Fuente: Elaboración propia.

Es importante hacer mención sobre la vía de reducción de nitrato a nitrito (**Fig. 44**) debido a que esta constituye una de las etapas fundamentales del proceso de desnitrificación, un mecanismo respiratorio anaeróbico esencial para el ciclo global del nitrógeno.

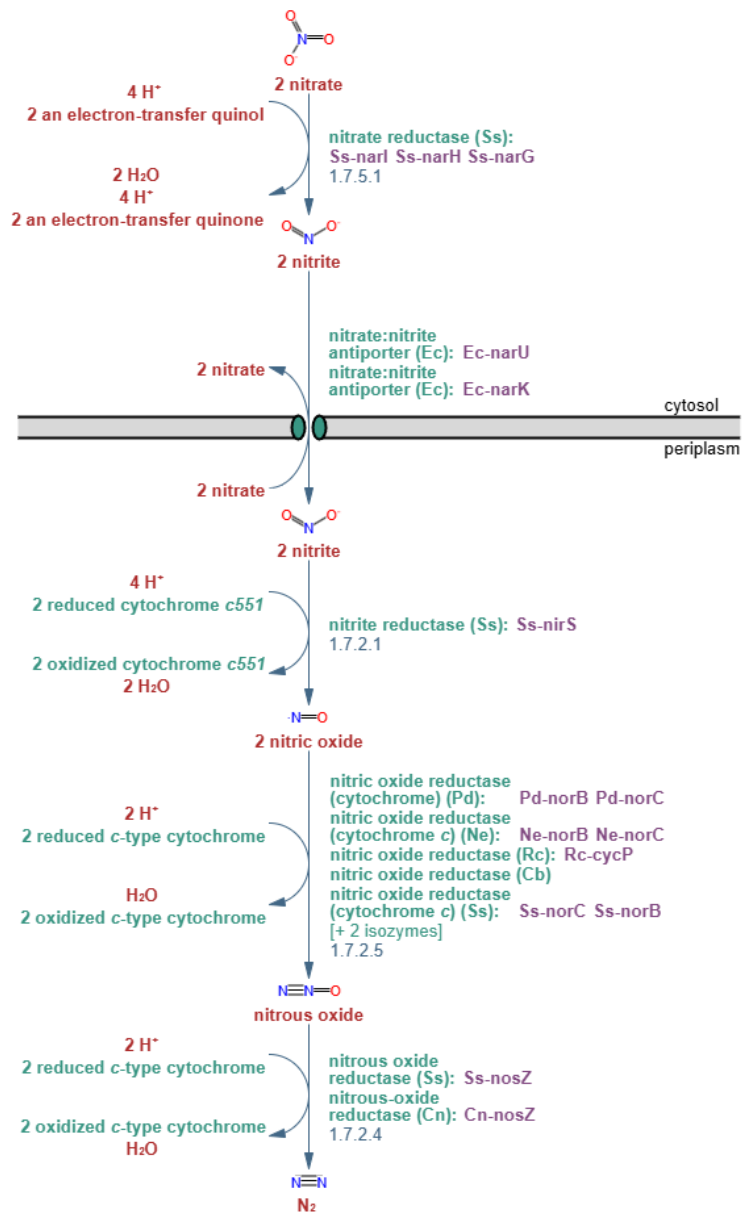


Figura 45. Representación esquemática de la vía de desnitrificación desde el nitrato hasta el nitrógeno molecular. Se muestra la reducción secuencial de nitrato a N_2 , destacando las enzimas clave involucradas: nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa. Fuente: Imagen extraída de la base de datos MetaCyc (metacyc.org).

En este proceso, el nitrato actúa como aceptor final de electrones, facilitando la transferencia de electrones desde una reserva de quinonas a través de una serie de enzimas especializadas: nitrato reductasa (EC 1.7.5.1), nitrito reductasa (EC 1.7.2.1), óxido nítrico reductasa (EC 1.7.2.5) y óxido nitroso reductasa (EC 1.7.2.4). Cada una de estas enzimas juega un papel clave al catalizar la reducción sucesiva del nitrato hasta nitrógeno molecular (N_2), cerrando así el ciclo del nitrógeno mediante la liberación de nitrógeno biológico a la atmósfera.

La nitrato reductasa, localizada en la membrana citoplasmática de bacterias Gramnegativas, da inicio al proceso al reducir nitrato a nitrito con un consumo simultáneo de protones. El nitrito, aunque es altamente tóxico, es transportado rápidamente al periplasma mediante intercambiadores específicos. En este compartimento, es transformado en productos menos tóxicos a través de las siguientes etapas de reducción: de nitrito a óxido nítrico, de óxido nítrico a gas nitroso y, finalmente, de gas nitroso a nitrógeno molecular. (Rosier et al., 2022)

6.8. Resultados variaciones de peso corporal medidas a diario

Se evaluaron las variaciones de peso corporal para cada una de las 16 ratas por cada grupo de estudio con el objetivo de identificar posibles efectos de toxicidad sistémica. Se calculó el porcentaje de variación de peso diario por rata, considerando como posible indicador de toxicidad una disminución de un 20% de peso corporal.

La **Figura 46** permite visualizar los resultados de las variaciones de peso diarias para cada rata, dando cuenta de que ninguno de los grupos mostró disminuciones de peso mayores al 20%. Esto sugiere que los tratamientos aplicados no generaron efectos tóxicos sistémicos evidentes en términos de pérdida de peso corporal.

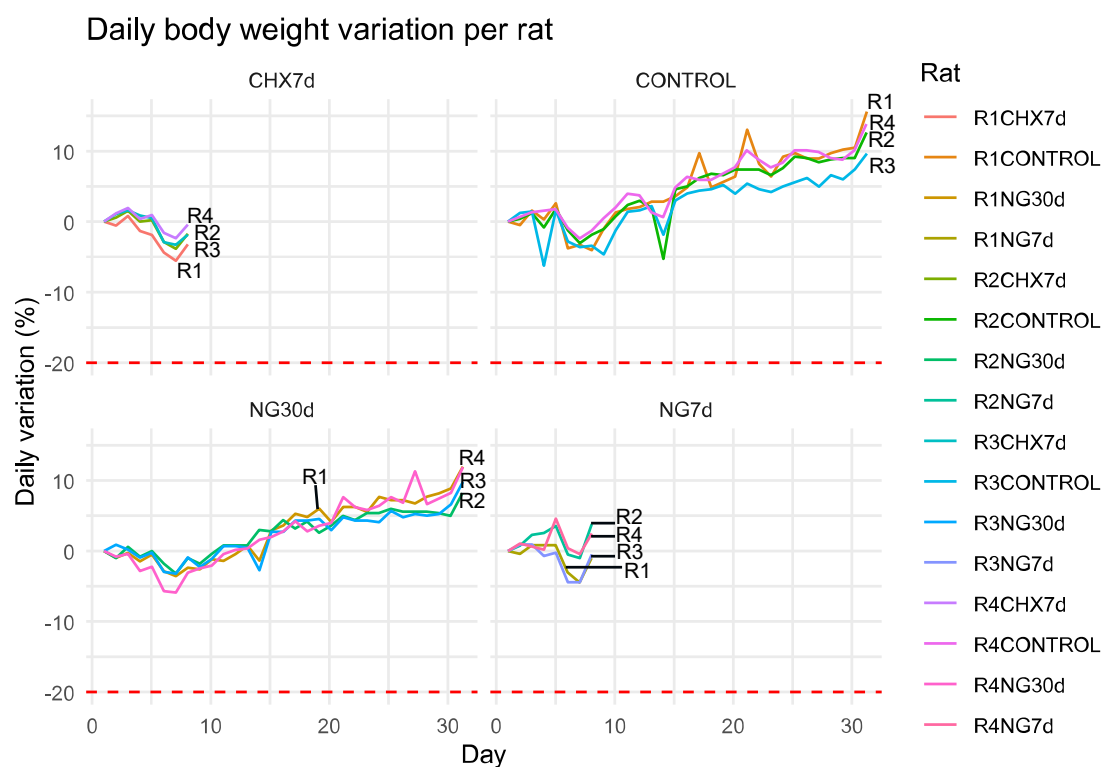


Figura 46. Variación diaria del peso corporal (%) en ratas (R1, R2, R3 y R4) según grupo de tratamiento. La línea roja punteada indica el umbral de -20%, considerado como una disminución significativa del peso corporal. Fuente: Elaboración propia.

6.9. Resultados para los pesos de órganos internos

Se evaluaron los pesos de 4 órganos internos (hígado, corazón, bazo y riñones) extraídos a partir de las disecciones en fresco de cada una de las 16 ratas de

ratas mediante pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk), homogeneidad de varianzas (Levene) y análisis estadísticos inferenciales (ANOVA o Kruskal-Wallis). Los resultados de las pruebas de normalidad indicaron que los grupos CONTROL ($p = 0.022$) y NG7d ($p = 0.00124$) no presentaron distribución normal para el peso del bazo. Este último grupo tampoco mostró distribución normal para los pesos del corazón ($p = 0.0012$) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Pruebas estadísticas de normalidad (Shapiro-Wilk: W y p), homogeneidad de varianzas (p de Levene) y diferencias significativas (ANOVA y Kruskal-Wallis, según corresponda) en el peso de órganos internos según grupo de tratamiento. Los valores de p indican el nivel de significancia estadística; NA denota que la prueba no se realizó debido a la no normalidad de los datos. Fuente: Elaboración propia.

Órgano	Grupo	W (Shapiro-Wilk)	p (Shapiro-Wilk)	p (Levene)	p (ANOVA)	p (Kruskal-Wallis)
Bazo	CHX7d	0.801	0.103	1.00	0.999	0.857
	CONTROL	0.725	0.022	1.00	NA	0.857
	NG30d	0.916	0.515	1.00	0.999	0.857
	NG7d	0.630	0.00124	1.00	NA	0.857
Corazón	CHX7d	0.945	0.683	1.00	0.999	0.857
	CONTROL	0.979	0.894	1.00	0.999	0.857
	NG30d	0.828	0.163	1.00	0.999	0.857
	NG7d	0.630	0.00124	1.00	NA	0.857
Hígado	CHX7d	0.952	0.727	1.00	0.999	0.857
	CONTROL	0.985	0.928	1.00	0.999	0.857
	NG30d	0.911	0.486	1.00	0.999	0.857
	NG7d	0.852	0.233	1.00	0.999	0.857
Riñones	CHX7d	0.763	0.0512	1.00	0.999	0.857
	CONTROL	0.827	0.161	1.00	0.999	0.857
	NG30d	0.918	0.528	1.00	0.999	0.857
	NG7d	0.811	0.123	1.00	0.999	0.857

Sin embargo, la prueba de Levene confirmó la homogeneidad de varianzas para todos los órganos evaluados ($p=1.00$), lo que permitió aplicar ANOVA en los casos con distribución normal. Tanto ANOVA como Kruskal-Wallis revelaron la ausencia de diferencias significativas entre los grupos para todos los órganos

analizados ($p>0.05$). De esta forma los resultados sugieren que ninguno de los tratamientos impactó significativamente en el peso de los órganos internos en comparación con el grupo control, lo que descarta efectos tóxicos observables asociados a esta variable. La visualización de las distribuciones de las medias para cada órgano interno por grupo se presenta en la **Figura 47**, mientras que los valores promedio por grupo y su desviación estándar se encuentran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Promedio y desviación estándar del peso de órganos internos en ratas según grupo de tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Órgano	Grupo	Media (g)	Desviación Estándar
Bazo	CHX7d	1.18	0.222
	CONTROL30d	0.825	0.419
	NG30d	0.85	0.332
	NG7d	1.12	0.250
Corazón	CHX7d	1.8	0.163
	CONTROL30d	1.45	0.451
	NG30d	1.62	0.359
	NG7d	1.78	0.0500
Riñones	CHX7d	3.85	0.238
	CONTROL30d	3.6	0.424
	NG30d	3.45	0.465
	NG7d	3.98	0.263
Hígado	CHX7d	18.1	2.03
	CONTROL30d	17.8	1.80
	NG30d	17.8	3.10
	NG7d	17.4	2.83

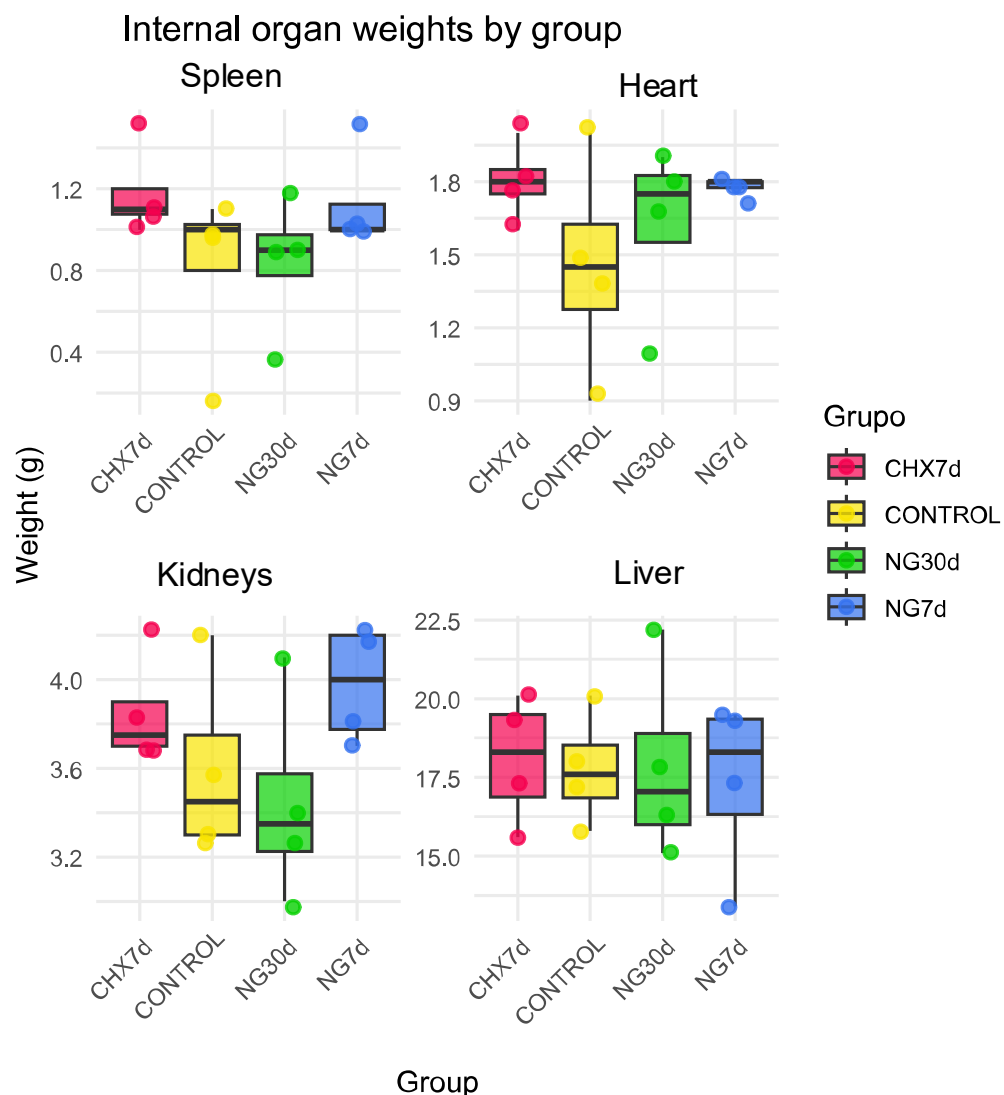


Figura 47. Boxplots de las distribuciones de los pesos (g) de los órganos internos medidos para cada uno de los grupos de estudio (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d). Se observan las distribuciones para el peso de Bazo (A), Corazón (B), Riñones (C) e Hígado (D). Fuente: Elaboración propia

6.10. Resultados consumo de alimentos por grupo de tratamiento

El análisis del consumo diario de alimentos medido en gramos para los grupos de tratamiento CHX7d y NG7d durante 7 días, y para los grupos Control y NG30d

durante 30 días, no reveló diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los períodos evaluados.

6.10.1. Comparación entre los grupos CHX7d y NG7d (7 días):

Mediante un análisis ANOVA (**Tabla 15**), no se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimentos entre los grupos ($p = 0.923$). El valor F obtenido fue de 0.01, lo que indica que la variación observada en el consumo entre los grupos es mínima y no atribuible a los tratamientos aplicados. Adicionalmente, la prueba post hoc de Tukey HSD arrojó una diferencia de medias de -0.5 gramos entre los grupos, con un intervalo de confianza al 95% de [-11.67, 10.67] y un p-valor ajustado de 0.923, confirmando la ausencia de diferencias significativas.

6.10.2. Comparación entre los grupos NG30d y CONTROL

El análisis ANOVA tampoco mostró diferencias significativas en el consumo de alimentos entre estos grupos ($p = 0.500$), con un valor F de 0.46. La prueba post hoc de Tukey HSD indicó una diferencia de medias de -2.7 gramos, con un intervalo de confianza al 95% de [-10.67, 5.27] y un p-valor ajustado de 0.500, lo que da cuenta de la ausencia de un impacto del tratamiento sobre el consumo de alimentos en el periodo de 30 días (**Fig. 47**).

Tabla 15. Resultados de las comparaciones estadísticas entre pares de grupos para el peso de órganos internos. La tabla presenta los valores de normalidad (p de Shapiro-Wilk), homogeneidad de varianzas (p de Levene), estadístico F y valor p del ANOVA, así como los resultados del post hoc de Tukey. Fuente: Elaboración propia.

Comparación	Normalidad (p)	Levene (p)	ANOVA F	ANOVA (p)	Tukey Diff	Tukey CI Lower	Tukey CI Upper	Tukey (p adj)
CHX7d vs NG7d	0.655	0.185	0.010	0.923	-0.5	-11.672	10.672	0.923
NG30d vs CONTROL	0.104	0.185	0.371	0.545	-2.1	-8.998	4.798	0.545

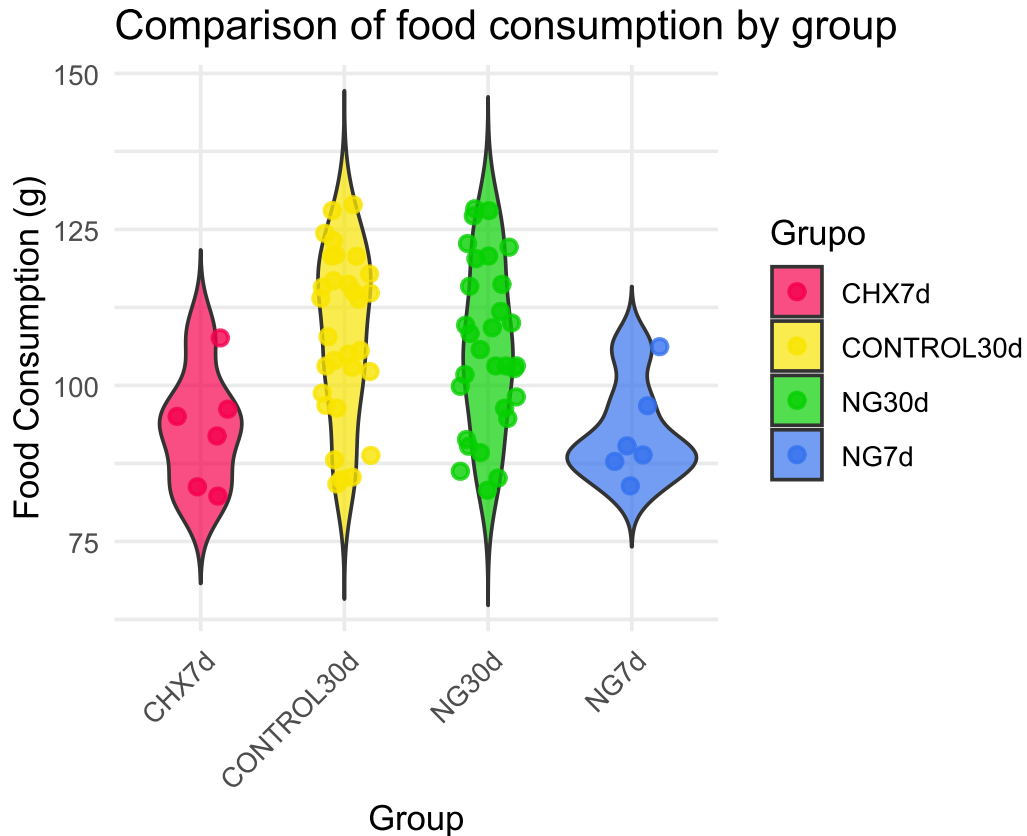


Figura 48. Distribución del consumo de alimento (g) por grupo de estudio (CHX7d, CONTROL, NG30d y NG7d). Los gráficos de violín representan la densidad de las mediciones, con puntos individuales correspondientes a las mediciones realizadas a diario para cada grupo de 4 individuos por jaula. Fuente: Elaboración propia

6.11. Resultados generales análisis sanguíneos

El análisis estadístico realizado permitió identificar diferencias significativas entre los grupos de estudio en varias variables hematológicas y bioquímicas, utilizando ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis según los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Las pruebas post hoc (Tukey o Dunn) permitieron precisar los grupos responsables de estas diferencias.

Las **tablas 16 y 17** permiten evidenciar que en el caso de hemoglobina (g/dl), se detectaron diferencias significativas (ANOVA, $p=0.0041$), con un aumento notable en el grupo NG7d en comparación con el grupo control ($p_{ajustado}=0.0026$). Para hematocrito (%), la prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.004$) mostró diferencias significativas entre CONTROL y NG7d ($p_{ajustado}=0.00495$). La variable VCM (fL) presentó diferencias altamente significativas (ANOVA, $p=0.000001$), destacando incrementos en el grupo NG7d frente a todos los demás grupos ($p_{ajustado}<0.001$). De manera similar, para HCM (pg), se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $p=0.0000001$), con valores más altos en NG7d en comparación con los grupos CONTROL y NG30d ($p_{ajustado}<0.001$).

En cuanto a RDW-CV (%), los análisis mostraron diferencias entre los grupos CONTROL y NG7d ($p_{ajustado}=0.0011$) y entre NG7d y NG30d ($p_{ajustado}=0.0004$). Para plaquetas (1000/ μ L), las diferencias fueron significativas (ANOVA, $p=0.019$), con incrementos en NG7d y NG30d respecto a CHX7d ($p_{ajustado}<0.05$). En la categoría de neutrófilos, se observaron diferencias significativas en la concentración absoluta ($p=0.007$ $p = 0.007$ $p=0.007$), con la prueba post hoc de Dunn identificando diferencias entre CONTROL y NG7d ($p_{ajustado}=0.056$).

Entre las variables bioquímicas, el análisis de fósforo (mg/dl) mostró diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p=0.025$ $p = 0.025$ $p=0.025$), destacando el grupo NG30d frente a CHX7d ($p_{ajustado}=0.019$). Para GGT (U/l), se detectaron diferencias altamente significativas (ANOVA, $p=0.0000008$), con valores más

altos en los grupos CONTROL y NG30d comparados con NG7d ($p_{\text{ajustado}} < 0.0001$). Finalmente, el colesterol (mg/dl) presentó aumentos significativos en NG30d frente a CHX7d ($p_{\text{ajustado}} = 0.041$), y en NG7d frente a CONTROL ($p_{\text{ajustado}} = 0.035$). Estos resultados destacan que los tratamientos con nanopartículas de cobre, especialmente en el grupo NG7d, indujeron modificaciones significativas en varios parámetros en comparación con los grupos control y los tratados con clorhexidina.

Tabla 16. Resultados de las pruebas estadísticas realizadas para las variables sanguíneas. Fuente: Elaboración propia.

Variable	Prueba	p value	Decisión
Eritrocitos(1000/ μ l)	ANOVA	0.294	No significativo
Hemoglobina (g/dL)	ANOVA	0.0041	Significativo
Hematocrito (%)	Kruskal-Wallis	0.004	Significativo
VCM (fL)	ANOVA	0.000001	Significativo
HCM (pg)	ANOVA	0.0000001	Significativo
CHCM (g/dl)	ANOVA	0.182	No significativo
RDW-CV (%)	ANOVA	0.00009	Significativo
Plaquetas (1000/ μ L)	ANOVA	0.019	Significativo
Leucocitos(1000/mm ³)	ANOVA	0.055	No significativo
Neutrófilos(1000/mm ³)	Kruskal-Wallis	0.007	Significativo
Neutrófilos (%)	ANOVA	0.473	No significativo
Linfocitos (1000/mm ³)	ANOVA	0.292	No significativo
Linfocitos (%)	ANOVA	0.713	No significativo
Monocitos(1000/mm ³)	Kruskal-Wallis	0.150	No significativo
Monocitos (%)	ANOVA	0.527	No significativo
Eosinófilos(1000/mm ³)	ANOVA	0.092	No significativo
Eosinófilos (%)	Kruskal-Wallis	0.487	No significativo
Urea(mg/dl)	Kruskal-Wallis	0.082	No significativo
Creatinina(mg/dl)	Kruskal-Wallis	0.470	No significativo
Fósforo(mg/dl)	Kruskal-Wallis	0.025	Significativo
Calcio(mg/dl)	Kruskal-Wallis	0.072	No significativo
Fosf. Alc (U/l)	Kruskal-Wallis	0.511	No significativo
GGT (U/l)	ANOVA	0.000000008	Significativo
AST (U/l)	Kruskal-Wallis	0.112	No significativo
ALT (U/l)	Kruskal-Wallis	0.785	No significativo
Bil. Total (mg/dl)	Kruskal-Wallis	0.008	Significativo
Colesterol (mg/dl)	ANOVA	0.007	Significativo
Glucosa (mg/dl)	Kruskal Wallis	0.017	Significativo
Albumina (mg/dl)	ANOVA	0.109	No significativo
PT Total (mg/dl)	Kruskal Wallis	0.007	Significativo
Globulina (mg/dl)	Kruskal Wallis	0.008	Significativo

Tabla 17. Resultados del análisis post hoc para variables significativas identificadas en el análisis post hoc (Tukey o Dunn, según el caso) junto con los valores p ajustados (p_{aj}).

Fuente: Elaboración propia

Variable	Post hoc significativo	Interpretación
Hemoglobina *	NG7d > CONTROL ($p_{aj}=0.0026$)	Significativo en NG7d
Hematocrito (%)	CONTROL < NG7d ($p_{aj} =0.00495$)	Significativo en NG7d
VCM (fL)	NG7d > CONTROL, NG30d ($p_{aj} <0.001$)	Significativo en NG7d
HCM (pg)	NG7d > CONTROL ($p_{aj} <0.001$)	Significativo en NG7d.
RDW-CV (%)	NG7d > CONTROL ($p_{aj} =0.0011$)	Significativo en NG7d.
Plaquetas **	NG7d, NG30d > CHX7d ($p_{aj} <0.05$)	Significativo en NG7d y NG30d.
Neutrófilos****	CONTROL < NG7d ($p_{aj} =0.056$)	Significativo en NG7d
Fósforo***	NG30d > CHX7d ($p_{aj} =0.019$)	Significativo en NG30d
GGT (U/l)	CONTROL, NG30d > NG7d ($p_{aj} <0.0001$)	Significativo en CONTROL y NG30d
Colesterol***	NG30d > CHX7d ($p_{aj} =0.041$), NG7d > CONTROL ($p_{aj} =0.035$)	Significativo en NG30d y NG7d
Glucosa***	-	No se observaron diferencias significativas tras ajustes post hoc.
PT Total *	NG30d > NG7d ($p_{aj} =0.0247$)	Significativo en NG30d
Globulina*	CONTROL < NG7d ($p_{aj} =0.043p$)	Significativo en NG7d.

*(g/dL);**(1000/ μ L);*** (mg/dL), ****(1000/mm³)

6.11.1. Hematología serie roja

Los parámetros hematológicos de la serie roja se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Valores promedio y desviaciones estándar de parámetros hematológicos relacionados con la serie roja. *(1000/ μ L);** (g/dL).S.D (Standart Deviation).Fuente: elaboración propia.

Variable	Grupo	Promedio	S.D	Rango de Referencia (Charles River)
Eritrocitos *	CHX7d	7,8275	0,19	7.77 – 8.19
	CONTROL	8,025	0,71	7.77 – 8.19
	NG30d	8,5175	0,31	7.77 – 8.19
	NG7d	8,05	0,58	7.77 – 8.19
Hemoglobina**	CHX7d	15,05	0,23	14.4 – 16.0
	CONTROL	13,6	1,07	14.4 – 16.0
	NG30d	14,575	0,29	14.4 – 16.0
	NG7d	16,15	1,03	14.4 – 16.0
Hematocrito (%)	CHX7d	44,6	0,73	41.2 – 47.3
	CONTROL	39,525	3,93	41.2 – 47.3
	NG30d	41,975	1,05	41.2 – 47.3
	NG7d	48,175	4,46	41.2 – 47.3
VCM (fL)	CHX7d	57,025	1,88	53.0 – 59.5
	CONTROL	49,2	1,38	53.0 – 59.5
	NG30d	49,275	0,97	53.0 – 59.5
	NG7d	59,85	2,23	53.0 – 59.5
HCM (pg)	CHX7d	19,2	0,38	18.3 – 20.0
	CONTROL	16,95	0,25	18.3 – 20.0
	NG30d	17,175	0,49	18.3 – 20.0
	NG7d	20,05	0,36	18.3 – 20.0
CHCM (g/dL)	CHX7d	33,75	0,45	32.7 – 35.7
	CONTROL	34,475	1,18	32.7 – 35.7
	NG30d	34,775	0,42	32.7 – 35.7
	NG7d	33,55	1,02	32.7 – 35.7
RDW-CV (%)	CHX7d	12,125	0,35	-
	CONTROL	13,375	0,42	-
	NG30d	13,575	0,52	-
	NG7d	11,925	0,22	-
Plaquetas**	CHX7d	376	293,11	379 – 967
	CONTROL	739,25	149,63	379 – 967
	NG30d	763,75	62,02	379 – 967

NG7d	775,25	100,77	379 – 967
------	--------	--------	-----------

*(1000/ μ L);** (g/dL)

Los parámetros de la serie roja mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. El grupo NG7d presentó incrementos significativos en variables clave como hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM y RDW-CV en comparación con el grupo control (pajustado < 0.005 en todos los casos).

Asimismo, se observaron valores elevados en el grupo NG30d, particularmente en la variable eritrocitos, que mostró una tendencia superior en relación a los demás grupos. Por otro lado, el grupo CHX7d presentó valores relativamente más bajos en estas variables, lo que podría sugerir una menor capacidad de respuesta eritropoyética en comparación con los tratamientos basados en nanopartículas de cobre. La **Tabla 18** muestra los valores promedio de las variables de la serie roja junto a la desviación estándar para cada grupo.

6.11.2. Hematología serie blanca

Los parámetros hematológicos relacionados con la serie blanca revelaron que, entre las variables estudiadas, neutrófilos ($1000/\text{mm}^3$) fue la única que mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales, según la prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.007$). La prueba post hoc de Dunn confirmó estas diferencias estadísticamente significativas en el grupo NG7d en comparación con el grupo CONTROL ($p_{\text{ajustado}}=0.056$).

El grupo NG7d presentó un promedio de neutrófilos de $1659,25 \pm 278,28$ ($1000/\text{mm}^3$), siendo menor en comparación con el grupo NG30d ($4130 \pm 1343,28$ ($1000/\text{mm}^3$)) y grupo CHX7d ($1895,5 \pm 249,127$ ($1000/\text{mm}^3$)).

En términos generales, el grupo NG30d mostró tendencias a mayores valores promedio en la concentración de neutrófilos en comparación con los grupos tratados con clorhexidina (CHX7d) o control.

Tabla 19. Valores promedio y desviaciones estándar de parámetros hematológicos relacionados con la serie blanca. Fuente: elaboración propia.

Variable	Grupo	Promedio	S.D	Rango de Ref. (Charles River)
Leucocitos (1000/mm3)	CHX7d	9500	1637,39	10.09 - 14.01
	control	13705	1744,79	10.09 - 14.01
	NG30d	15237,5	4125,62	10.09 - 14.01
	NG7d	9107,5	4669,47	10.09 - 14.01
Neutrófilos (1000/mm3)	CHX7d	1895,5	249,127	0.91 - 1.70
	control	3276,25	1212,77	0.91 - 1.70
	NG30d	4130	1343,28	0.91 - 1.70
	NG7d	1659,25	278,28	0.91 - 1.70
Neutrófilos (%)	CHX7d	20,5	4,87	8.20 - 14.50
	control	24,25	6,55	8.20 - 14.50
	NG30d	26,85	4,43	8.20 - 14.50
	NG7d	21,275	8,10	8.20 - 14.50
Linfocitos (1000/mm3)	CHX7d	6757,75	1854,01	8.50 - 12.10
	control	9128,25	1313,57	8.50 - 12.10
	NG30d	9622,5	2378,87	8.50 - 12.10
	NG7d	6529,75	4280,66	8.50 - 12.10
Linfocitos (%)	CHX7d	70,3	7,87	80.20 - 86.00
	control	66,85	7,40	80.20 - 86.00
	NG30d	63,625	4,50	80.20 - 86.00
	NG7d	67,575	11,10	80.20 - 86.00
Monocitos (1000/mm3)	CHX7d	679,5	151,39	0.10 - 0.46
	control	972,75	343,50	0.10 - 0.46
	NG30d	1229,75	458,35	0.10 - 0.46
	NG7d	782	306,16	0.10 - 0.46
Monocitos (%)	CHX7d	7,4	2,52	2.10 - 3.40
	control	7,025	2,12	2.10 - 3.40
	NG30d	7,925	0,75	2.10 - 3.40
	NG7d	9,1	2,30	2.10 - 3.40
Eosinófilos (1000/mm3)	CHX7d	159,75	66,53	0.10 - 0.16
	control	249,75	72,81	0.10 - 0.16
	NG30d	234,75	139,97	0.10 - 0.16
	NG7d	93,5	40,87	0.10 - 0.16
Eosinófilos (%)	CHX7d	1,725	0,86	1.00 - 1.50
	control	1,8	0,34	1.00 - 1.50
	NG30d	1,475	0,57	1.00 - 1.50
	NG7d	1,275	0,97	1.00 - 1.50

Variable	Grupo	Promedio	S.D	Rango de Ref. (Charles River)
Baciliformes (1000/mm3)	CHX7d	7,5	5,25	-
	control	0	0	-
	NG30d	0	0	-
	NG7d	2,75	5,5	-
Baciliformes (%)	CHX7d	0,075	0,05	-
	control	0	0	-
	NG30d	0	0	-
	NG7d	0,025	0,05	-
Basófilos (1000/mm3)	CHX7d	0	0	0.00 - 0.10
	control	11,75	8,5	0.00 - 0.10
	NG30d	20,5	14,43	0.00 - 0.10
	NG7d	0	0	0.00 - 0.10
Basófilos (%)	CHX7d	0	0	0.30 - 1.00
	control	0,075	0,05	0.30 - 1.00
	NG30d	0,125	0,05	0.30 - 1.00
	NG7d	0	0	0.30 - 1.00

6.11.3. Química Clínica

En cuanto a los parámetros bioquímicos sanguíneos se identificaron diferencias significativas entre los grupos experimentales para varias variables (**Tabla 20**)

GGT (U/l): Los análisis de ANOVA indicaron diferencias altamente significativas ($p=0.0000008$). Los valores más altos se observaron en los grupos CONTROL y NG30d, mientras que NG7d presentó los niveles más bajos ($p_{ajustado}<0.0001$). Este patrón sugiere una variación en la actividad enzimática hepática dependiente del tipo de tratamiento.

Fósforo (mg/dL): La prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.025$) reveló diferencias significativas, con el grupo NG30d presentando un aumento significativo en comparación con CHX7d ($p_{ajustado}=0.019$). Este incremento podría asociarse con el impacto prolongado de las nanopartículas de cobre en el metabolismo mineral. (Figura 57).

Colesterol (mg/dL): ANOVA mostró diferencias significativas ($p=0.007$), con incrementos notables en NG30d frente a CHX7d ($p_{ajustado}=0.041$) y en NG7d frente al grupo CONTROL ($p_{ajustado}=0.035$). Estos resultados destacan posibles alteraciones en el metabolismo lipídico inducidas por los tratamientos.

Glucosa (mg/dL): Aunque se observaron aumentos en NG7d frente a los demás grupos, las diferencias no fueron significativas tras ajustes post hoc. Sin embargo, el promedio elevado en NG7d (227,5 mg/dL) podría estar relacionado con una respuesta metabólica específica al tratamiento a corto plazo.

Proteínas Totales (Pt) (g/dL): Las diferencias entre los grupos fueron significativas ($p=0.007$), con valores más altos en NG7d en comparación con CONTROL y NG30d. Este resultado podría reflejar una síntesis proteica aumentada o una modulación inmunológica.

Tabla 20. Valores promedio y desviaciones estándar (S.D) de parámetros bioquímicos sanguíneos. Fuente: elaboración propia.

Variable	Grupo	Promedio	S. D	Rango de Ref. (Charles River)
Urea*	CHX7d	53,75	3,20	-
	CONTROL	42,5	3	-
	NG30d	42	1,41	-
	NG7d	53,5	16,44	-
Creatinina*	CHX7d	0,725	0,05	0.50 - 0.60
	CONTROL	0,6	0,2	0.50 - 0.60
	NG30d	0,675	0,05	0.50 - 0.60
	NG7d	0,75	0,19	0.50 - 0.60
Fósforo*	CHX7d	5,8	0,14	7.30 - 10.00
	CONTROL	4,95	2,96	7.30 - 10.00
	NG30d	7,2	0,57	7.30 - 10.00
	NG7d	6,125	0,64	7.30 - 10.00
Calcio*	CHX7d	8,725	0,33	9.40 - 11.00
	CONTROL	6,675	3,38	9.40 - 11.00
	NG30d	8,125	0,17	9.40 - 11.00
	NG7d	9,125	0,88	9.40 - 11.00
Fosf. Alc.**	CHX7d	160	22,28	136.00 - 188.00
	CONTROL	157,5	15,45	136.00 - 188.00
	NG30d	169	14,09	136.00 - 188.00
	NG7d	150,25	16,17	136.00 - 188.00
GGT**	CHX7d	5,35	0,64	0.00 - 1.00
	CONTROL	15,7	0,78	0.00 - 1.00
	NG30d	15,025	1,60	0.00 - 1.00
	NG7d	4,925	0,26	0.00 - 1.00
AST **	CHX7d	124	14,02	87.00 - 114.00
	CONTROL	152,05	5,51	87.00 - 114.00
	NG30d	132,05	12,28	87.00 - 114.00
ALT **	CHX7d	66	9,30	28.00 - 40.00
	CONTROL	71,9	6,23	28.00 - 40.00
	NG30d	70,075	6,70	28.00 - 40.00
	NG7d	79,25	31,43	28.00 - 40.00
Bil total*	CHX7d	0,165	0,02	0.10 - 1.00
	CONTROL	0,08	0,0081	0.10 - 1.00
	NG30d	0,0875	0,015	0.10 - 1.00
	NG7d	0,185	0,044	0.10 - 1.00

Variable	Grupo	Promedio	S. D	Rango de Ref. (Charles River)
Colesterol**	CHX7d	43,25	6,849	54.00 - 74.00
	CONTROL	61,75	11,67	54.00 - 74.00
	NG30d	62,5	8,66	54.00 - 74.00
	NG7d	42	7,34	54.00 - 74.00
Glucosa**	CHX7d	158,5	17,07	112.00 - 176.00
	CONTROL	121,25	8,26	112.00 - 176.00
	NG30d	125,75	11,11	112.00 - 176.00
	NG7d	227,5	152,88	112.00 - 176.00
Albumina** *	CHX7d	3,85	0,12	3.30 - 4.60
	CONTROL	3,7	0,244	3.30 - 4.60
	NG30d	3,575	0,17	3.30 - 4.60
	NG7d	4,025	0,36	3.30 - 4.60
PT Total***	CHX7d	6,6	0,081	5.90 - 6.60
	CONTROL	5,8	0,21	5.90 - 6.60
	NG30d	5,65	0,17	5.90 - 6.60
	NG7d	7	0,54	5.90 - 6.60
Globulina** *	CHX7d	2,75	0,0577	-
	CONTROL	2,1	0,14	-
	NG30d	2,075	0,262	-
	NG7d	2,975	0,50	-

*(mg/dL), ** (U/l), (1000/ μ L), *** (g/dL).

6.12. Actividad ALT medida mediante kit colorimétrico y análisis estadístico

Se evaluó la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en los cuatro grupos experimentales: NG7d, CHX7d, Control y NG30d. La actividad ALT se determinó mediante un ensayo colorimétrico, midiendo la conversión de piruvato a 570 nm en un lector de microplacas, y los datos se analizaron utilizando herramientas estadísticas y gráficas.

Se generaron gráficos de boxplot y barplot para visualizar la distribución y la media de la actividad ALT entre los grupos.

La actividad ALT fue mayor en el grupo Control, seguida de NG30d, NG7d, y finalmente CHX7d. Sin embargo, las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

Las pruebas estadísticas incluyeron la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene), las cuales indicaron que los datos cumplían con los supuestos para realizar una prueba paramétrica ANOVA. Finalmente, análisis de varianza (ANOVA) arrojó un valor p de 0.4876, lo que indica que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad ALT entre los grupos ($p > 0.05$).

A partir de lo anterior, los resultados sugieren que los tratamientos experimentales no generaron una alteración significativa en la actividad ALT comparada con el grupo control. Aunque se observó una tendencia hacia valores

mayores en el grupo Control, estas diferencias no pueden atribuirse a los efectos de los tratamientos aplicados según el análisis estadístico realizado.

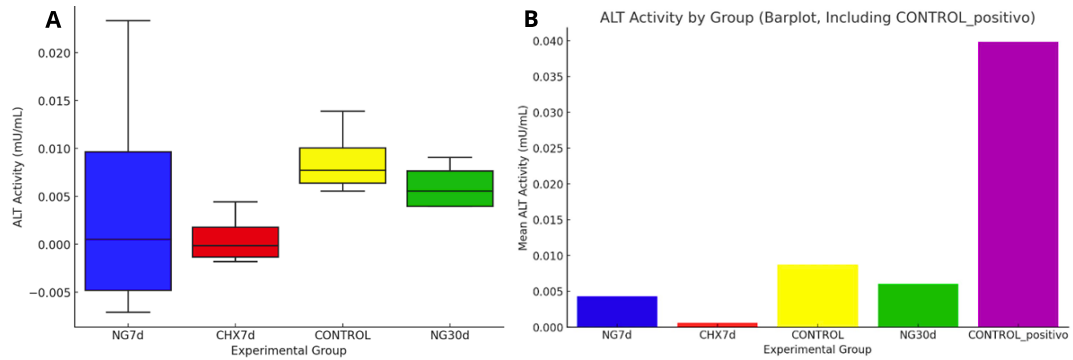


Figura 49. Comparación de la actividad de alanina aminotransferasa (ALT) en los diferentes grupos experimentales. (A) Distribución de la actividad ALT (mU/mL) en los grupos NG7d, CHX7d, Control y NG30d. (B) Gráfico de barras para la media de la actividad ALT (mU/mL) incluyendo un grupo Control positivo como referencia. Fuente: Elaboración propia.

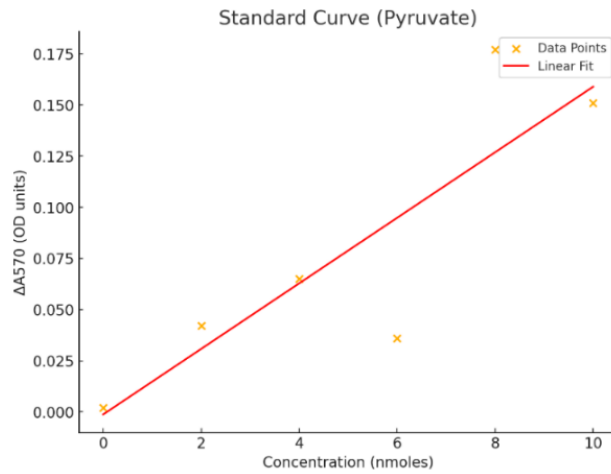


Figura 50. Curva estándar de piruvato utilizada para la determinación de actividad ALT. Se presenta la relación lineal entre la concentración de piruvato (nmoles) y la absorbancia medida a 570 nm (ΔA_{570} , unidades de densidad óptica). Fuente: Elaboración propia.

6.13. Resultados análisis por TEM y SEM EDS

En el análisis realizado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) cuya visualización corresponde a la de la **Figura 51** y microscopía electrónica de barrido con dispersión de rayos X (SEM-EDS) (**Figura 52**), se obtuvieron resultados complementarios para evaluar la presencia de nanopartículas de cobre en los tejidos renales y en el suero sanguíneo de las ratas sometidas a tratamiento. Por un lado, las imágenes TEM del suero sanguíneo permitieron identificar nanopartículas metálicas compatibles con cobre en cuatro ratas (R1NG7d, R1NG30d, R2NG7d y R4NG7d). Estas nanopartículas presentaron formas mayoritariamente esféricas en agrupaciones cuyos tamaños oscilaron entre 12 nm y 500 nm. Estas nanopartículas se sometieron a confirmación cristalográfica a través de patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED). Los hallazgos sugieren una biodistribución y acumulación específica en ciertos individuos.

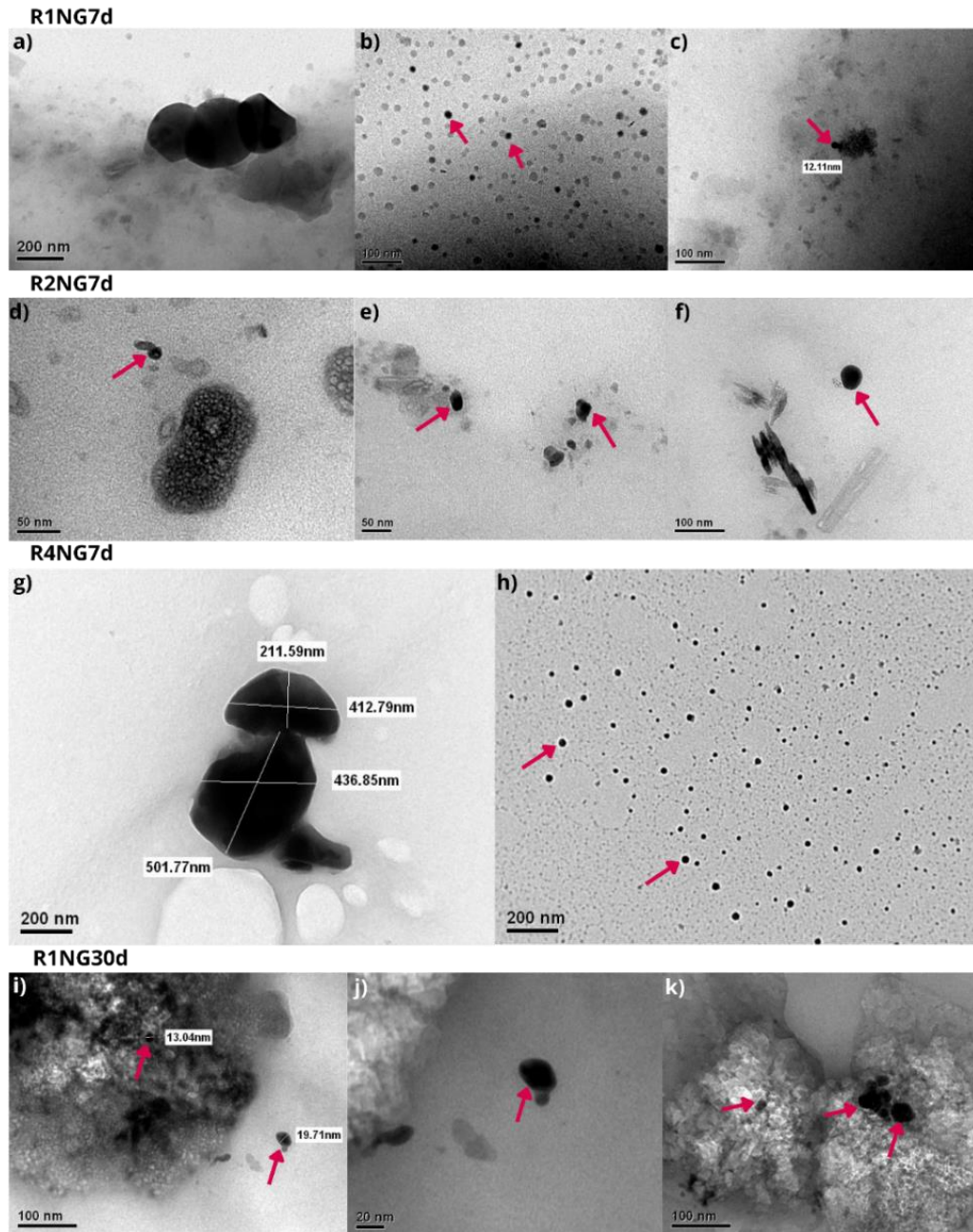


Figura 51. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del suero sanguíneo de ratas expuestas a nanopartículas de cobre. Las flechas señalan nanopartículas identificadas en las muestras: (a-c) R1NG7d, (d-f) R1NG30d, (g-h) R2NG7d, y (i-k) R4NG7d. Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, las imágenes obtenidas mediante SEM-EDS (**Fig. 52**), enfocadas en los túbulos colectores renales, revelaron estructuras anatómicas que consisten en pequeños canalículos renales bien definidos y una compleja red de conductos. Sin embargo, en ninguna de las 16 ratas evaluadas se detectaron nanopartículas compatibles con cobre en estos tejidos. Este resultado destaca la ausencia de acumulación de cobre en los túbulos colectores a pesar de su identificación en el suero sanguíneo, lo que podría indicar una limitada retención renal de las nanopartículas o una rápida eliminación a través de otros mecanismos fisiológicos.

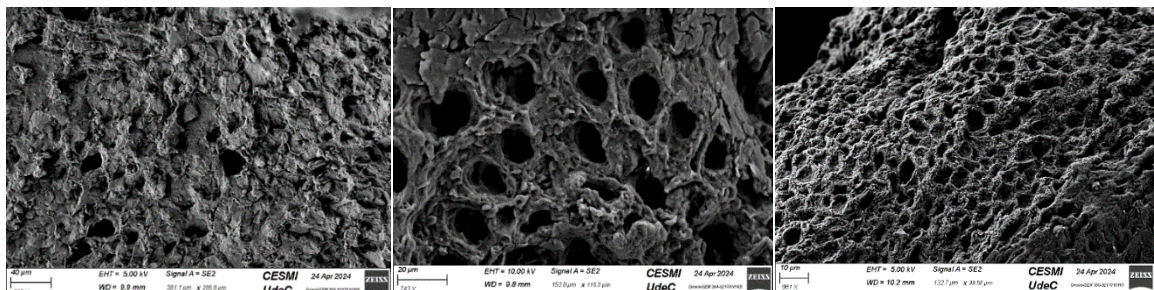


Figura 52. Microscopía electrónica de barrido SEM-EDS, para la detección de elementos químicos metálicos con un índice de refracción específico para cobre. A nivel de túbulos colectores renales de ratas expuestas a nanopartículas de cobre, así como también las no expuestas no exhibieron nanopartículas compatibles con este elemento. Las observaciones refuerzan la ausencia de acumulación detectable de cobre a nivel renal, incluso tras la exposición a NPCu de cobre en diferentes tratamientos. Fuente: Elaboración propia.

7. DISCUSIÓN

Esta investigación constituye un aporte relevante al entendimiento del impacto de las nanopartículas de cobre (NPCu) en la microbiota oral y su potencial como alternativa terapéutica en odontología. Utilizando un modelo animal de ratas Sprague-Dawley, se evaluaron de manera comparativa los efectos de un gel de NPCu y un gel de clorhexidina (CHX), considerado estándar de referencia como antiséptico bucal. El estudio abarcó dos enfoques u objetivos principales: la caracterización de los cambios en la composición, estructura y vías funcionales predictivas de la microbiota oral, y la evaluación de parámetros sistémicos de toxicidad, incluyendo perfiles hematológicos, peso de órganos internos y biomarcadores hepáticos como la ALT.

Los resultados obtenidos en esta investigación realzan la importancia de las tecnologías de secuenciación de longitud completa, como Oxford Nanopore, para el análisis de comunidades bacterianas en contextos de alteraciones inducidas por tratamientos antimicrobianos. Según Johnson et al., (2019), el gen *16S rRNA*, ampliamente utilizado en estudios de microbiomas, ofrece una resolución taxonómica significativamente mejor cuando se secuencia en su longitud completa (~1500 pb), en comparación con métodos que se centran en regiones parciales, como las plataformas basadas en Illumina. Esto se debe a que las lecturas completas permiten capturar la variabilidad entre las nueve regiones variables del gen, lo cual es esencial para identificar diferencias a nivel de especie

e incluso cepa. Sin embargo, es importante tener presente que en la presente investigación se ha logrado llegar a una precisión a nivel predictivo de especie bacteriana.

En este sentido, de acuerdo a Curry et al., (2024) también se ha destacado la capacidad de las tecnologías de secuenciación de tercera generación para generar lecturas completas y precisas es esencial para caracterizar comunidades bacterianas complejas, especialmente en estudios que evalúan el impacto de intervenciones antimicrobianas.

Además, Johnson et al., (2019) enfatiza que las tecnologías de tercera generación, como Oxford Nanopore, ofrecen la capacidad de resolver variantes intragenómicas del gen *16S rRNA*, incluidas diferencias en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Este avance es esencial para estudios que demandan una resolución taxonómica precisa, ya que permite diferenciar entre copias divergentes del gen *16S rRNA* dentro de un mismo genoma, algo que no es factible con plataformas de secuenciación de lectura corta. En el contexto de nuestro estudio, esta capacidad mejora sustancialmente el análisis de cambios ecológicos inducidos por tratamientos antimicrobianos, facilitando una caracterización más detallada de las comunidades bacterianas y de su estructura funcional.

Johnson et al. (2019) también destaca que el manejo adecuado de estas variantes intragenómicas tiene el potencial de incrementar la capacidad

discriminatoria para resolver comunidades bacterianas a nivel de especie e incluso cepa, siempre que se implementen métodos computacionales robustos capaces de mitigar errores de secuenciación y PCR. Sin embargo, advierten que las plataformas de lectura larga, como las utilizadas en este trabajo, no están exentas de desafíos técnicos, incluyendo la necesidad de gestionar las redundancias intragenómicas y las limitaciones en la precisión de las lecturas largas.

En este sentido, el modelo probabilístico implementado en herramientas como Emu resulta particularmente relevante. Aunque el algoritmo de Emu no aborda explícitamente la variabilidad intragenómica del gen *16S rRNA*, su enfoque basado en un modelo de maximización de expectativas (EM) maneja errores de asignación taxonómica derivados de bases de datos incompletas, mutaciones en secuencias y errores propios de la tecnología de secuenciación (Curry et al., 2022). Este modelo iterativo ajusta las probabilidades de asignación al considerar el perfil comunitario completo, mitigando indirectamente problemas relacionados con la redundancia intragenómica. Por tanto, la integración de tecnologías de secuenciación de longitud completa con algoritmos como Emu refuerza la robustez del análisis realizado, permitiendo una interpretación más confiable de los cambios microbianos inducidos por los tratamientos con NPCu y clorhexidina.

En relación con la calidad de las lecturas y la asignación taxonómica, en las muestras del grupo control, los altos porcentajes de reads asignados (por

ejemplo, R4CONTROL: 97.7%) y las mayores concentraciones de ADN (R1CONTROL: 29,4 ng/μl) reflejan una representación robusta de la diversidad microbiológica basal. Esto se alinea con los hallazgos de Jeong et al., (2021), quienes demostraron que las lecturas de longitud completa permiten una asignación taxonómica más precisa y menos sesgada, incluso en muestras con alta complejidad microbiana. Por el contrario, en los grupos tratados con NPCu, particularmente tras exposiciones prolongadas de 30 días, se observaron los valores más bajos de reads asignados (3.9%-6.5%), lo que puede atribuirse tanto a los efectos antimicrobianos del tratamiento como a la mayor complejidad taxonómica resultante, evidenciada por iteraciones elevadas del algoritmo EM.

Por otra parte, los resultados obtenidos en las métricas de diversidad alfa proporcionaron una base relevante para evaluar la estabilidad y las diferencias estructurales de la microbiota oral entre cada uno de los grupos experimentales. A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en índices como Richness, Chao1, Shannon y Simpson, los valores obtenidos ofrecen indicios importantes sobre cómo los tratamientos influyen en las comunidades bacterianas.

Los índices de Richness y Chao1, que miden la riqueza taxonómica de las comunidades, ofrecen una perspectiva complementaria sobre la diversidad bacteriana. Richness cuantifica el número de taxones observados, mientras que Chao1 incluye estimaciones de taxones poco representados, proporcionando una

visión más completa de la comunidad. En este estudio, los valores más altos de ambos índices en el grupo control y en el grupo tratado con NPCu durante 7 días reflejan la preservación de una comunidad microbiana diversa y estable, característica de un equilibrio ecológico en ausencia de presiones significativas. Sin embargo, la disminución observada en los índices para el grupo tratado con NPCu durante 30 días indica un impacto acumulativo del tratamiento, que podría estar modulando la microbiota hacia comunidades menos diversificadas, pero más especializadas funcionalmente. Este fenómeno puede atribuirse a los efectos antimicrobianos selectivos de las NPCu, que promueven una reestructuración comunitaria al favorecer la eliminación de taxones más susceptibles y la supervivencia de aquellos más adaptados a las condiciones impuestas por el tratamiento. Estos hallazgos son consistentes con los resultados de Berrio et al., (2024), quienes documentaron un marcado efecto bactericida en estudios con similares formulaciones de geles de NPCu basados en PVP/PVA a una concentración de 1 mM.

En relación con los índices de Shannon y Simpson, junto con la métrica de Evenness, ofrecen perspectivas complementarias sobre la diversidad y distribución de las comunidades bacterianas. En este sentido, el índice de Shannon combina la riqueza y la equidad en una comunidad, proporcionando una medida más robusta de diversidad general. Valores más altos indican tanto mayor número de especies como una distribución más uniforme de estas. Por otro lado, el índice de Simpson se centra en la probabilidad de que dos individuos

seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie, con valores más altos reflejando una menor dominancia de ciertas especies. La métrica de Evenness, que mide la uniformidad en la distribución de abundancias dentro de la comunidad, mostró valores más equilibrados en el grupo control y en el grupo tratado con NPCu por 7 días en comparación con el grupo tratado con CHX. Este resultado podría estar relacionado con la actividad selectiva de las NPCu, que parecen preservar las comunidades bacterianas de manera más equilibrada al evitar la dominancia de ciertas especies y la eliminación excesiva de otras, como ocurre en tratamientos más agresivos.(Regueira-Iglesias, Balsa-Castro, et al., 2023b)

En este estudio, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los índices de Shannon y Simpson, los valores obtenidos fueron más similares entre el grupo control y el grupo tratado con NPCu por 7 días. Este patrón sugiere que el tratamiento con nanopartículas de cobre a corto plazo podría preservar la estructura general de la comunidad bacteriana, al menos en términos de diversidad alfa, sin causar alteraciones severas en la distribución relativa de taxones. Sin embargo, este patrón de estabilidad en la diversidad alfa contrasta marcadamente con los resultados de las métricas de diversidad beta, que revelaron diferencias significativas en la composición microbiana entre los grupos experimentales.

El análisis de diversidad beta, basado en los índices de Bray-Curtis y Jaccard, mostró mediante análisis de coordenadas principales (PCoA) una clara separación entre los grupos tratados con NPCu y CHX en comparación con el grupo control. Esto indica que, aunque las métricas de diversidad alfa reflejan cierta estabilidad en términos de riqueza y equidad, las comunidades microbianas experimentaron transformaciones estructurales importantes bajo los tratamientos evaluados. En particular, los grupos tratados con NPCu evidenciaron un efecto antimicrobiano selectivo que promovió una reorganización comunitaria hacia configuraciones más homogéneas y específicas.

Desde una perspectiva biológica, la reorganización comunitaria inducida por las NPCu no solo modifica significativamente la diversidad beta, sino que también transforma la composición bacteriana de manera selectiva. Este efecto podría orientar la microbiota hacia comunidades menos patogénicas, lo que sugiere un posible beneficio clínico en contextos como la desinfección de superficies periimplantarias. En contraste, la menor diferenciación observada con clorhexidina podría explicarse por su amplio espectro de acción, que afecta tanto a bacterias benéficas como potencialmente patógenas. Esta distinción en los mecanismos antimicrobianos refuerza la idea de que las NPCu podrían ofrecer una modulación más dirigida de la microbiota oral.

Por otro lado, los grupos tratados con CHX presentaron un impacto notable en la microbiota oral, caracterizado por una reducción significativa en la riqueza

taxonómica, lo que evidencia un efecto antimicrobiano amplio que afecta tanto a bacterias benéficas como potencialmente patógenas. Sin embargo, los análisis de diversidad beta, como el PCoA basado en Bray-Curtis y Jaccard, sugieren que la composición microbiana del grupo tratado con CHX mantiene cierta similitud con la del grupo control, aunque con una menor complejidad taxonómica. Este patrón podría reflejar la capacidad de la CHX para eliminar taxones menos abundantes o más susceptibles, promoviendo una comunidad más limitada pero estructuralmente cercana a la microbiota basal. Este hallazgo es consistente con estudios previos, como el de Hyde et al., (2014), que documentaron alteraciones significativas en la microbiota oral de lenguas de ratas Wistar inducidas por CHX, destacando que el grado de impacto varía según la concentración y la duración del tratamiento.

Además de los análisis de diversidad alfa y beta, resulta fundamental explorar las modificaciones específicas en la composición y estructura de la microbiota oral en los distintos grupos experimentales. En esta línea, Hyde et al. (2014) caracterizaron la composición microbiana de la lengua de ratas Wistar, observando que, en ausencia de tratamiento, las comunidades bacterianas estaban dominadas por los géneros *Haemophilus*, *Streptococcus* y *Neisseria*. Estos géneros se asociaron con un perfil microbiano equilibrado y funcional, característico de un microbioma basal saludable. Sin embargo, las ratas tratadas con clorhexidina (CHX) mostraron un cambio notable en la composición, con una disminución significativa de *Haemophilus parainfluenzae* y *Aggregatibacter*,

taxones clave en la reducción de nitratos a nitritos, mientras que *Enterobacteriaceae* spp. y *Corynebacterium* spp. aumentaron en abundancia relativa. Estos cambios reflejan la acción antimicrobiana generalizada de la CHX, que no solo reduce la carga bacteriana total, sino que también altera el equilibrio taxonómico al favorecer la proliferación de especies oportunistas y menos deseables.

En el presente estudio, el grupo CHX7d mostró un patrón similar, caracterizado por una disminución en la riqueza taxonómica y un perfil de diversidad beta más cercano al grupo control al igual que en términos de composición, pero con una menor diversidad alfa. Este fenómeno puede explicarse por la eliminación de taxones menos abundantes y la subsiguiente dominancia de géneros como *Streptococcus* spp. y *Neisseria* spp. Además, la detección de *Neisseria meningitidis* en este grupo sugiere un posible efecto de selección de especies patógenas oportunistas bajo presión antimicrobiana, lo que podría ser relevante desde una perspectiva clínica al evaluar los riesgos asociados al uso prolongado de CHX en la cavidad oral. Desde una perspectiva funcional, los resultados destacan una dicotomía interesante: mientras que las nanopartículas de cobre parecen actuar de manera selectiva promoviendo la expansión de ciertas especies adaptadas, la clorhexidina muestra un efecto más amplio, favoreciendo la emergencia de especies asociadas a entornos de perturbación tales como *N. meningitidis*. Esta diferencia sugiere que, si bien ambos agentes tienen efectos antimicrobianos, sus impactos ecológicos sobre la comunidad microbiana difieren

de manera fundamental. Por otro lado, las comunidades bacterianas del grupo control destacaron por su heterogeneidad, con géneros como *Rodentibacter* spp. y *Ruegeria* spp., lo que subraya la resiliencia ecológica en ausencia de perturbaciones externas.

Por otra parte, Cheng et al., (2022b) llevaron a cabo un estudio en el que evaluaron el impacto del tratamiento con antibióticos, específicamente amoxicilina (AMX), espiramicina (ESP) y metronidazol (MTZ), sobre la saliva, la microbiota oral y el contenido de anticuerpos en ratas Sprague Dawley. A nivel taxonómico, observaron que los tratamientos con AMX y MTZ promovieron aumentos significativos en géneros como *Rothia* spp., *Haemophilus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Lactobacillus* spp., reflejando un impacto sustancial y dependiente del tipo de antibiótico en la composición microbiana. Los phyla dominantes, *Pseudomonadota* y *Bacillota*, mostraron una reorganización marcada bajo la influencia de estos antibióticos, mientras que *Actinobacteria* y *Bacteroidota* presentaron variaciones según el tratamiento.

En términos de diversidad, se reportaron incrementos en los índices de Shannon y Simpson en los grupos tratados con AMX y MTZ, lo que indica una mayor heterogeneidad en las comunidades bacterianas. Este fenómeno puede atribuirse al establecimiento de bacterias resistentes a los antibióticos, un hallazgo consistente con investigaciones previas que vinculan el uso de antibióticos con una mayor diversidad microbiana (Dudek-Wicher et al., 2018b),

aunque con comunidades menos funcionales y más propensas a la disbiosis. Además, los análisis de diversidad beta revelaron agrupamientos específicos de las comunidades tratadas con AMX y MTZ, diferenciándose significativamente del grupo control y del grupo tratado con SP. Este último presentó un impacto más moderado, lo que refuerza la idea de que el efecto de los antibióticos varía según su espectro y mecanismo de acción.

Estos hallazgos ofrecen un marco comparativo valioso al analizar los resultados de la microbiota oral obtenidos en el presente estudio. En nuestro grupo control, los perfiles taxonómicos comparten similitudes con las observaciones de Cheng et al., particularmente en la predominancia de *Streptococcus* spp. y *Rodentibacter* spp., y la estabilidad de phyla clave como *Pseudomonadota*, *Bacillota* y *Actinomycetota*. Sin embargo, los tratamientos con nanopartículas de cobre (NPCu) en este trabajo indujeron transformaciones específicas que contrastan marcadamente con los efectos de los antibióticos. Mientras que AMX y MTZ promovieron un aumento en la diversidad alfa y reorganizaron las comunidades hacia estados más heterogéneos, las NPCu generaron una reestructuración más selectiva pero donde la diversidad alfa disminuyó en comparación al grupo control, pero ofreciendo valores promedio casi cercanos que los obtenidos por el grupo tratado con CHX y con NPCu por 30 días. Esto es evidente en la aparición de géneros como *Ruegeria* spp., *Cognatiyoonia* spp. y *Halocynthiibacter* spp. en los grupos tratados con NPCu, los cuales reemplazan a géneros dominantes en el grupo control.

La comparación entre los efectos de los antibióticos y las nanopartículas de cobre (NPCu) en la microbiota oral de ratas revela tanto similitudes como diferencias fundamentales en sus mecanismos de acción. En ambos casos, los phyla *Pseudomonadota* (ex *Proteobacteria*), *Bacillota* (ex *Firmicutes*) y *Actinomycetota* (ex *Actinobacteria*) emergen como los grupos taxonómicos más abundantes, lo que sugiere una composición basal relativamente conservada en la microbiota oral de ratas, consistente con estudios previos. Sin embargo, la forma en que estos tratamientos modulan estas comunidades difiere significativamente.

Los antibióticos, especialmente amoxicilina y metronidazol, inducen cambios más generalizados, promoviendo una reorganización de las comunidades bacterianas hacia estados más heterogéneos, caracterizados por un incremento en la diversidad alfa y la emergencia de bacterias resistentes. Este fenómeno puede observarse en la mayor abundancia relativa de géneros como *Rothia* spp. y *Lactobacillus* spp., que reflejan una alteración funcional y estructural profunda en la microbiota. En contraste, los tratamientos con NPCu, aunque también alteran significativamente la composición bacteriana, lo hacen de manera más específica, generando una reestructuración dominada por géneros como *Ruegeria* spp., *Cognatibacter* spp. y *Halocynthibacter* spp.. Esta transformación sugiere un reemplazo casi total de las comunidades bacterianas originales, manteniendo, sin embargo, ciertas similitudes a nivel de phyla con el grupo control, pero más relacionadas a los phylum *Bacteroidota* y *Bacillota*.

Dado el impacto significativo de las NPCu en la composición microbiana, calificarlas como menos disruptivas podría resultar impreciso. Los resultados sugieren que estas nanopartículas ejercen una presión antimicrobiana selectiva, promoviendo una transición hacia comunidades microbianas funcionalmente adaptadas al tratamiento. Aunque este efecto difiere del observado con los antibióticos, resalta el potencial de las NPCu como herramientas terapéuticas en contextos odontológicos.

Asimismo, estos hallazgos resaltan la necesidad de llevar a cabo estudios más exhaustivos sobre las implicancias funcionales de los cambios inducidos por las nanopartículas de cobre (NPCu) en la microbiota oral humana. Un aspecto crítico que requiere atención es si, tras su aplicación terapéutica, la microbiota oral es capaz de recuperar un estado inicial compatible con la salud, y cuánto tiempo podría tardar dicho proceso. Esto es particularmente relevante en contextos donde se busca modular comunidades bacterianas patológicas, como en la periimplantitis, una condición caracterizada por una mayor diversidad microbiana respecto a la mucositis periimplantar, pero con un marcado perfil disbiótico. (Philip et al., 2022)

Aunque las NPCu han demostrado un efecto antimicrobiano selectivo, promoviendo la reorganización de comunidades microbianas, su potencial para facilitar un tránsito desde la disbiosis hacia la eubiosis no está completamente esclarecido. En este contexto, las NPCu podrían desempeñar un papel relevante

como adyuvantes en tratamientos mecánicos estándar, tal como se ha propuesto en enfoques terapéuticos actuales para la periimplantitis. (Philip et al., 2022) Sin embargo, este planteamiento abre preguntas críticas sobre los riesgos y beneficios de inducir alteraciones profundas en la composición microbiota: ¿estas reestructuraciones ofrecen un terreno fértil para la recolonización de taxones beneficiosos, o podrían crear escenarios de vulnerabilidad para la colonización de patógenos oportunistas?

Además, el impacto funcional de las NPCu sobre rutas metabólicas clave, especialmente en comunidades bacterianas resilientes o adaptadas a entornos altamente alterados, requiere un análisis detallado. Esto resulta esencial para evaluar si los cambios inducidos son compatibles con un microambiente oral que promueva la estabilidad ecológica y la salud del hospedero. Por tanto, la aplicación de NPCu en odontología debe ser contextualizada no solo como una herramienta antimicrobiana, sino también como una intervención que requiere una planificación cuidadosa para minimizar riesgos y maximizar su potencial terapéutico en el mediano largo plazo. Este enfoque integrado podría marcar la diferencia en el diseño de tratamientos personalizados y basados en evidencia en la práctica clínica.

La detección de los géneros *Ruegeria* spp., *Cognatiyoonia* spp. y *Halocynthiibacter* spp. en los grupos tratados con nanopartículas de cobre (NPCu) amplía significativamente el entendimiento de cómo estas intervenciones

afectan la composición y funcionalidad de la microbiota oral. Estos géneros, previamente asociados a entornos marinos, emergen como indicadores de un cambio ecológico inducido por las presiones selectivas de las NPCu, destacando el potencial de estas comunidades para adaptarse a condiciones de estrés extremo (Pinto et al., 2020). Sin embargo, su aparición plantea preguntas críticas sobre el equilibrio entre los beneficios antimicrobianos de las NPCu y las posibles consecuencias ecológicas adversas, especialmente en términos de estabilidad comunitaria y funcionalidad metabólica.

En el caso de *Ruegeria* spp., su aparición en la microbiota oral tras el tratamiento con NPCu destaca la capacidad de este género para adaptarse a ambientes selectivos con presiones antimicrobianas específicas. Originalmente asociado a ambientes marinos, *Ruegeria* spp. presenta características metabólicas versátiles que incluyen la capacidad de algunas especies para realizar respiración anaeróbica facultativa mediante la reducción de nitratos (Wirth & Whitman, 2018). Esta capacidad, junto con la síntesis de polihidroxibutirato en ciertas especies, indica una adaptabilidad funcional que podría ser relevante en la microbiota reorganizada por NPCu. Además, las especies de *Ruegeria* exhiben variabilidad en su motilidad, siendo móviles a través de flagelación polar o peritrica dependiendo de la especie, y muestran adaptaciones a ambientes con salinidad variable mediante el uso de Na⁺ o Mg²⁺ para su crecimiento. Estos atributos, junto con el predominio de ácidos grasos como el C18:1 ω7c, reflejan

una plasticidad ecológica que podría explicar su capacidad para prosperar en la microbiota oral alterada.

Sin embargo, la presencia de *Ruegeria* spp. en este nuevo contexto plantea importantes cuestiones ecológicas y funcionales. Su capacidad para reemplazar taxones nativos esenciales podría generar cambios disruptivos en la dinámica metabólica local, afectando procesos críticos para la homeostasis del hospedero. Desde un punto de vista más amplio, la colonización de *Ruegeria* spp. podría interpretarse como una señal de reestructuración funcional de la microbiota oral, con implicaciones tanto positivas como negativas. Si bien su presencia podría mejorar la resiliencia de la microbiota a través de la producción de metabolitos secundarios protectores, también podría exacerbar un colapso funcional si la eliminación de taxones nativos esenciales no es compensada adecuadamente.

Por su parte, *Cognatibacter* spp. y *Halocynthiibacter* spp. aportan perspectivas complementarias para comprender los efectos de las NPCu sobre las comunidades bacterianas. El primero, clasificado dentro de la familia *Rhodobacteraceae*, se caracteriza por células Gramnegativas, aeróbicas, con formas de bastón a óvalo y una preferencia por condiciones halofílicas moderadas. Entre sus rasgos funcionales más relevantes destaca su capacidad para reducir nitratos, lo que sugiere un potencial papel en ciclos de nitrógeno dentro de comunidades reorganizadas (Wirth & Whitman, 2018). En el contexto de tratamientos con NPCu, estas características podrían permitir a *Cognatibacter*

spp. colonizar nichos ecológicos vacantes, contribuyendo al reciclaje de nutrientes y promoviendo estabilidad funcional en comunidades bacterianas alteradas. Sin embargo, la introducción de este género plantea interrogantes sobre el impacto a largo plazo de tales reestructuraciones, particularmente en términos de equilibrio ecológico y resiliencia comunitaria.

Por otro lado, *Halocynthiibacter* spp. aporta una perspectiva interesante sobre los efectos de las NPCu en la reorganización microbiana debido a sus características metabólicas y fisiológicas específicas. Este género, compuesto por bacterias aeróbicas, Gramnegativas y de forma de bastón, se encuentra dentro de la clase *Alphaproteobacteria*, siendo representado por especies como *H. namhaensis*, aislada originalmente de ambientes marinos. Aunque su incapacidad para reducir nitratos limita su participación en ciertos ciclos biogeoquímicos clave, su capacidad para prosperar en condiciones halofílicas moderadas y a un rango de pH óptimo entre 7,0 y 7,5 subraya su adaptabilidad a entornos con presiones osmóticas moderadas (Kim et al., 2014).

En el contexto de la microbiota oral reorganizada tras el tratamiento con NPCu, la presencia de *Halocynthiibacter* spp. podría estar vinculada a su capacidad para prosperar en condiciones selectivamente alteradas, como aquellas con concentraciones variables de NaCl y un requerimiento específico de iones Mg²⁺ para el crecimiento. Estas adaptaciones fisiológicas reflejan una resiliencia inherente, aunque su relevancia funcional en la microbiota oral sigue siendo

incierto debido a la ausencia de ciertas actividades metabólicas importantes, como la producción de bacterioclorofila a, y la incapacidad de hidrolizar compuestos clave como almidón, gelatina y urea. Estas limitaciones metabólicas sugieren que su papel en comunidades reorganizadas podría ser más pasivo que activo, actuando como un colonizador secundario que ocupa nichos ecológicos vacantes en lugar de contribuir significativamente a procesos metabólicos esenciales.

Desde una perspectiva crítica, la incorporación de *Halocynthiibacter* spp. en microbiotas tratadas con NPCu plantea preguntas relevantes sobre la estabilidad funcional a largo plazo. Aunque su presencia podría interpretarse como una señal de reorganización microbiana, también podría indicar una disbiosis funcional si su proliferación ocurre a expensas de taxones nativos con funciones esenciales en la homeostasis oral. La ausencia de crecimiento bajo condiciones anaeróbicas y su requerimiento de condiciones estrictamente aeróbicas limitan su versatilidad ecológica, lo que podría reducir su impacto en la dinámica metabólica de una microbiota diversa como la oral.

Es necesario abordar estas cuestiones mediante estudios adicionales que evalúen el impacto funcional de *Halocynthiibacter* spp., *Ruegeria* spp. y *Cognatiboonia* spp. en el contexto de microbiotas alteradas por NPCu. Investigaciones que combinen análisis metagenómicos y transcriptómicos permitirían dilucidar si este género contribuye a la resiliencia comunitaria o, por

el contrario, refleja una transición hacia un ecosistema microbiano menos diverso y potencialmente más vulnerable. Este enfoque crítico es esencial para entender si su incorporación representa un efecto colateral de las presiones selectivas de las NPCu o si, bajo ciertas condiciones, podría desempeñar un papel funcional relevante en la microbiota reorganizada.

En relación a los cambios observados en las vías metabólicas funcionales predictivas, en este trabajo destaca el impacto diferencial de los tratamientos con nanopartículas de cobre (NPCu) y clorhexidina (CHX) en la microbiota oral. Si bien ambos tratamientos generaron alteraciones significativas en la actividad de múltiples rutas metabólicas clave, sus efectos evidencian mecanismos contrastantes de acción, con implicancias tanto locales como sistémicas.

La mayor actividad de la vía de reducción de nitrato a nitrito en los grupos tratados con NPCu, en comparación con CHX y el grupo control, plantea cuestiones relevantes sobre el rol de esta ruta en la conservación de funciones metabólicas esenciales. Esta vía no solo es central en la desnitrificación y la síntesis de óxido nítrico (NO), sino que también tiene implicaciones significativas en la regulación de la homeostasis cardiovascular y la resiliencia metabólica de las comunidades bacterianas orales. Como lo reportan Rosier et al.(2022), el óxido nítrico derivado del nitrato tiene propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias que modulan la composición bacteriana, favoreciendo géneros asociados con la salud, como

Rothia spp. y *Neisseria* spp., mientras disminuye microorganismos vinculados a enfermedades como *Prevotella* spp. y *Fusobacterium* spp. (Rosier et al., 2022).

Además, estudios previos han vinculado la disminución de NO en la cavidad oral, particularmente por el uso prolongado de CHX, con efectos adversos a nivel sistémico como hipertensión arterial y un aumento de estados inflamatorios sistémicos (Rosier et al., 2022). Estos hallazgos destacan la importancia de la actividad de la vía del nitrato en prevenir el deterioro metabólico causado por la disbiosis. Asimismo, trabajos previos de Rosier et al. (2020) demostraron cómo la suplementación con nitrato puede inducir eubiosis en el microbioma oral al favorecer el crecimiento de géneros reductores de nitrato asociados con la salud, como *Neisseria* spp. y *Rothia* spp., mientras reducen géneros relacionados con condiciones patológicas, como *Porphyromonas* spp. y *Fusobacterium* spp. (Rosier et al., 2020). Este efecto se asocia con un aumento en la producción de amonio y una disminución en los niveles de lactato, lo que estabiliza el pH en un rango menos ácido. Este fenómeno no solo previene la acidificación local asociada con la fermentación de carbohidratos, sino que también contribuye a la reducción de los periodos de desmineralización del esmalte dental y limita las condiciones que favorecen el desarrollo de caries y periodontitis.

Estos hallazgos destacan el papel central del metabolismo del nitrato como un regulador funcional del equilibrio ecológico en la microbiota oral. En este contexto, las NPCu, al preservar la actividad de la vía de reducción de nitrato a

nitrito, podrían promover cierta resiliencia metabólica de comunidades bacterianas reorganizadas bajo una nueva composición y estructura, limitando los efectos negativos de agentes antimicrobianos más agresivos. Sin embargo, el impacto funcional directo sobre la salud del hospedero humano requiere mayor exploración en estudios clínicos.

En contraste, la preponderancia de rutas como la glicólisis, la fermentación y la biosíntesis de estructuras celulares en el grupo CHX subraya un metabolismo adaptativo centrado en la recuperación energética. Este perfil podría estar asociado con el estrés metabólico inducido por el tratamiento, el cual probablemente actúa de manera inespecífica, alterando tanto bacterias comensales como potencialmente patógenas. Sin embargo, este enfoque amplio, aunque efectivo como antiséptico, podría comprometer la resiliencia de la microbiota, promoviendo un estado de disbiosis funcional que podría ser menos deseable desde una perspectiva terapéutica.

Por otro lado, los perfiles metabólicos más diversificados y anabólicos observados en los grupos tratados con NPCu, especialmente en NG30d, sugieren que este tratamiento podría fomentar comunidades más funcionales y adaptadas al entorno modificado por la presión antimicrobiana. La mayor expresión de vías relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos y la respiración en estos grupos refleja un potencial para soportar funciones críticas de la microbiota, incluso bajo condiciones de estrés antimicrobiano.

Desde una perspectiva crítica, aunque los tratamientos con NPCu preservan o potencian funciones metabólicas específicas, también es importante considerar las posibles consecuencias a largo plazo de estas modificaciones. ¿La reorganización hacia perfiles metabólicos más especializados garantiza la estabilidad funcional de la microbiota oral, o podría predisponer al ecosistema a una mayor vulnerabilidad frente a factores de estrés futuros? La aparición de géneros como *Ruegeria* spp. y *Cognatibacter* spp. en los grupos tratados con NPCu, previamente asociados con entornos marinos, plantea preguntas importantes sobre la estabilidad y compatibilidad ecológica de estas comunidades en el contexto oral. Aunque estas bacterias podrían aportar nuevas capacidades funcionales, su integración plena en el ecosistema debe ser evaluada en términos de su impacto en las dinámicas metabólicas locales y en la salud del hospedero, sobre todo pensando en el traslado a un modelo clínico humano.

Los resultados relacionados con el segundo objetivo de esta investigación refuerzan la relevancia de evaluar las implicancias sistémicas de los tratamientos antimicrobianos, particularmente en un modelo experimental como el de ratas Sprague-Dawley. La ausencia de pérdida significativa de peso corporal en todos los grupos, junto con la estabilidad observada en los pesos de órganos internos (hígado, riñones, corazón y bazo), sugiere que los tratamientos con nanopartículas de cobre (NPCu) no generaron efectos tóxicos evidentes a nivel sistémico en las condiciones evaluadas. Estos hallazgos son consistentes con

los análisis hematológicos y bioquímicos, donde las diferencias observadas en variables específicas reflejan respuestas adaptativas más que indicativas de daño sistémico.

El análisis de las variables hematológicas de la serie roja en este estudio revela diferencias significativas entre los grupos experimentales, particularmente en el grupo tratado con NPCu durante 7 días (NG7d). Este grupo presentó incrementos en hemoglobina (16.15 ± 1.03 g/dL), hematocrito ($48.17 \pm 4.46\%$), volumen corpuscular medio (VCM, 59.85 ± 2.23 fL) y hemoglobina corpuscular media (HCM, 20.05 ± 0.36 pg) en comparación con el grupo control. Al evaluar estos parámetros frente a los rangos históricos reportados por el laboratorio Charles River para ratas Sprague-Dawley machos (hemoglobina: 15.07 g/dL (14.40-16.00); hematocrito: 43.93% (41.20-47.30); VCM: 55.17 fL (53.00-59.50); HCM: 18.96 pg (18.30-20.00), se observa que, aunque los valores de hemoglobina y hematocrito en el grupo NG7d exceden ligeramente los límites superiores de referencia, permanecen cercanos al rango fisiológico reportado (Giknis et al., 2006) (Charles River Laboratories, 2012). Asimismo, lo expresa He et al., (2017b) Esto sugiere una posible activación de la eritropoyesis inducida por el tratamiento, sin evidenciar toxicidad sistémica evidente.

En contraste, el grupo tratado con clorhexidina durante 7 días (CHX7d) mostró valores más bajos de hemoglobina (15.05 ± 0.23 g/dL), hematocrito ($44.6 \pm 0.73\%$) y HCM (19.2 ± 0.38 pg), todos dentro de los rangos de referencia

establecidos. Esta observación podría reflejar un impacto más moderado y menos específico en la homeostasis eritropoyética. Por otro lado, el grupo tratado con NPCu durante 30 días (NG30d) presentó valores intermedios, con hemoglobina (14.58 ± 0.29 g/dL) y hematocrito ($41.98 \pm 1.05\%$) también dentro de los rangos de referencia, lo que sugiere un efecto acumulativo menos pronunciado en comparación con el tratamiento de corto plazo.

En cuanto al conteo de eritrocitos, los valores promedio en los grupos NG7d ($8.05 \pm 0.58 \times 10^6/\mu\text{L}$) y NG30d ($8.52 \pm 0.31 \times 10^6/\mu\text{L}$) se encuentran en el extremo superior del rango de referencia histórico ($7.96 \times 10^6/\mu\text{L}$ [7.77-8.19]), lo que refuerza la hipótesis de un estímulo eritropoyético asociado al tratamiento con NPCu. Sin embargo, en el grupo CHX7d ($7.83 \pm 0.19 \times 10^6/\mu\text{L}$), los valores permanecen dentro de los límites normales, reflejando un menor impacto del tratamiento con clorhexidina en esta variable.

Los resultados hematológicos observados en el grupo tratado con CuNPs durante 7 días, si bien mostraron incrementos significativos en parámetros como hematocrito y hemoglobina, se mantuvieron dentro de los rangos fisiológicos reportados para ratas Sprague-Dawley, lo que sugiere una adaptación más que una toxicidad evidente. Esta interpretación es consistente con lo descrito por Lee et al. (2016), quienes reportaron que dosis subcrónicas de CuNPs pueden inducir respuestas hematológicas dosis-dependientes, incluyendo anemia microcítica o cambios inmunitarios, a partir de 200 mg/kg/día. En nuestro estudio, la dosis fue

considerablemente menor y no se observaron signos clínicos de toxicidad ni alteraciones estructurales en órganos blanco. Estudios adicionales han reforzado esta visión al evidenciar que las CuNPs pueden generar alteraciones hematológicas o hepatorreñales en modelos experimentales solo bajo exposiciones prolongadas o a dosis elevadas (Malik et al., 2024; Lee et al., 2016). En este contexto, los cambios observados podrían reflejar una activación fisiológica moderada, posiblemente relacionada con la estimulación de la eritropoyesis por efecto del cobre, sin alcanzar umbrales patológicos.

En relación con la serie blanca, los resultados evidenciaron diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control, algunas de las cuales se encontraron fuera de los rangos reportados por Charles River Laboratories, para ratas Sprague-Dawley. Estos hallazgos podrían indicar un estado inflamatorio basal o inducido por los tratamientos. Asimismo, los monocitos presentaron valores superiores al rango en todos los grupos, siendo más pronunciado en NG30d (1.23 ± 0.46), lo que refuerza la hipótesis de una inflamación crónica modulada por las NPCu. En contraste, los linfocitos totales en CHX7d (6.76 ± 1.85) y NG7d (6.53 ± 4.28) mostraron una disminución marcada en comparación con el control (9.13 ± 1.31), posiblemente reflejando una inmunosupresión relativa asociada a los tratamientos. Los eosinófilos se encontraron mayoritariamente dentro del rango reportado (0.10 - 0.16), excepto en NG7d (0.09 ± 0.04), que presentó una ligera disminución, lo cual podría estar relacionado con una menor respuesta alérgica o parasitaria. Finalmente, los

basófilos estuvieron ausentes en los grupos CHX7d y NG7d, mientras que NG30d y el control presentaron valores bajos pero dentro del rango de referencia (0.00 - 0.10). Estos resultados resaltan las diferencias en la modulación inmunológica de los tratamientos con NPCu y CHX, evidenciando que las NPCu pueden inducir efectos inmunomoduladores específicos, particularmente en la regulación de monocitos y neutrófilos, mientras que CHX podría asociarse con una inmunosupresión más amplia. Estos hallazgos, aunque dentro de rangos no patológicos en su mayoría, subrayan la necesidad de investigaciones futuras para explorar las implicancias funcionales de estas alteraciones en la homeostasis inmunológica.

Desde el punto de vista bioquímico, los incrementos en fósforo y colesterol observados en el grupo NG30d destacan como marcadores metabólicos potenciales asociados con la exposición prolongada a las nanopartículas de cobre (NPCu). Sin embargo, estos cambios no se correlacionaron con alteraciones funcionales detectables en órganos internos ni con toxicidad hepática, como lo demuestran los análisis de la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). Ambos biomarcadores son considerados indicadores clave de lesión hepatocelular, aunque es importante destacar que ALT es más específica para daño hepático, mientras que AST puede reflejar actividad en otros tejidos, como el corazón y el músculo esquelético.

En este estudio, la actividad de ALT medida como biomarcador sérico en la química sanguínea y contrastada y confirmada por el ensayo colorimétrico mostró valores que oscilaron entre 66 y 79 U/L, alineándose con los valores promedio de referencia reportados para ratas CD-IGS (65 ± 32 U/L para machos y 56 ± 32 U/L para hembras, según Charles River Laboratories (Charles River Laboratories, 2011)). Estas mediciones fueron consistentes con los resultados obtenidos mediante química sanguínea estándar, lo que refuerza la fiabilidad de los datos y la ausencia de hepatotoxicidad significativa. Además, los niveles de AST, que oscilaron entre 124 y 157 U/L, también estuvieron dentro del rango normal de referencia (113 ± 64 U/L para machos y 111 ± 65 U/L para hembras), confirmando la estabilidad de la función hepática.

De acuerdo con Senior (2012), aunque las elevaciones de ALT y AST son útiles como herramientas diagnósticas iniciales, no deben interpretarse de manera aislada como indicativas de daño hepático severo o funcionalidad hepática alterada, ya que estas enzimas reflejan principalmente liberación celular más que la capacidad funcional del hígado. Este concepto enfatiza la importancia de considerar tanto los valores absolutos como la relación ALT/AST y su contexto experimental. En este caso, la relación ALT/AST en los grupos tratados con NPCu y clorhexidina estuvo por debajo de 1, lo que sugiere que no hubo una alteración significativa atribuible a los tratamientos.

En conclusión, los datos sugieren que las NPCu, bajo las condiciones de este estudio, no inducen hepatotoxicidad significativa. Este hallazgo, respaldado por mediciones obtenidas a través de métodos independientes y por comparación con literatura previa, resalta el potencial seguro de estas nanopartículas para aplicaciones biomédicas, aunque se recomienda precaución al extrapolar estos resultados a otros modelos o especies.

Por otra parte, los análisis complementarios mediante microscopía electrónica (TEM y SEM-EDS) permitieron identificar nanopartículas de cobre en el suero sanguíneo de ciertos individuos, aunque no se detectó acumulación en los túbulos colectores renales. Este hallazgo es relevante, ya que sugiere que las NPCu tienen una biodistribución controlada y posiblemente una eliminación eficiente a través de mecanismos fisiológicos, minimizando el riesgo de toxicidad acumulativa. No obstante, la presencia de nanopartículas en el torrente sanguíneo plantea interrogantes sobre su interacción con otros tejidos y sistemas, especialmente a largo plazo.

A partir de las observaciones obtenidas mediante microscopía electrónica, es posible sugerir que la biodisponibilidad y el destino de las nanopartículas de cobre están determinados por procesos dinámicos que podrían variar según el tejido y el individuo. Este hallazgo sugiere que no solo los órganos tradicionalmente asociados con la filtración, como los riñones, deben ser considerados en futuros análisis, sino también aquellos órganos que cumplen funciones fisiológicas

críticas y que podrían verse afectados por la llegada o acumulación de estas nanopartículas. Esta hipótesis plantea la necesidad de ampliar el rango de evaluación toxicológica a otros sistemas orgánicos, con especial énfasis en estudios de biodistribución a largo plazo.

Desde una perspectiva crítica, aunque los resultados de este estudio no evidencian efectos tóxicos significativos asociados al uso de NPCu, es necesario considerar el contexto de estas observaciones. Los cambios detectados en ciertos parámetros hematológicos y bioquímicos reflejan adaptaciones metabólicas específicas que, aunque no patológicas en este modelo, podrían generar implicancias clínicas en humanos. Además, la limitada retención de las NPCu en tejidos evaluados, como los riñones, no descarta la posibilidad de acumulación en otros órganos o sistemas, lo que nos lleva a destacar la necesidad de realizar estudios más extensos que incluyan análisis de biodistribución y toxicidad a largo plazo.

Finalmente, los tratamientos con NPCu no generaron toxicidad sistémica evidente en este modelo experimental. Sin embargo, las alteraciones observadas en parámetros específicos destacan la importancia de continuar investigando los mecanismos subyacentes y sus implicancias clínicas antes de considerar el uso de NPCu como una alternativa terapéutica segura en contextos humanos. Estas observaciones también refuerzan la necesidad de implementar enfoques

integrados que combinen la evaluación de toxicidad con el análisis funcional para garantizar la seguridad y eficacia de estos compuestos.

8. CONCLUSIONES

1. Efecto antimicrobiano selectivo de las nanopartículas de cobre (NPCu):

Los tratamientos con NPCu demostraron un efecto antimicrobiano selectivo en la microbiota oral, evidenciado por una reestructuración taxonómica que favoreció la emergencia de géneros como *Ruegeria*, *Cognatiyoonia* y *Halocynthiibacter*. Estos cambios sugieren una capacidad adaptativa de la microbiota frente a las presiones antimicrobianas específicas ejercidas por las NPCu, sin comprometer significativamente la diversidad alfa, evaluada mediante índices como Shannon y Chao1.

2. Preservación de vías metabólicas predictivas:

Las nanopartículas de cobre (NPCu) mantienen la capacidad funcional metabólica esencial de las comunidades microbianas orales, especialmente en vías relacionadas con la reducción de nitrato a nitrito, diferenciándose claramente del efecto metabólico disruptivo inducido por la clorhexidina (CHX).

3. Ausencia de toxicidad sistémica significativa:

Los resultados obtenidos a partir del análisis del peso corporal, pesos relativos de órganos internos y parámetros bioquímicos y hematológicos indican que, bajo las condiciones evaluadas en este modelo experimental, las nanopartículas de cobre (NPCu) no presentan toxicidad sistémica significativa. Los cambios observados en algunos parámetros

hematológicos permanecieron dentro de rangos fisiológicos normales, reforzando la seguridad relativa del tratamiento con NPCu en el contexto evaluado.

4. Distribución controlada de las NPCu:

Las nanopartículas de cobre (NPCu) mostraron una distribución controlada en el organismo, detectándose en el suero sanguíneo pero sin evidencias de acumulación en los túbulos renales. Este hallazgo indica que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, las NPCu presentan un perfil favorable de seguridad en términos de biodistribución y eliminación sistémica.

5. Comparación con clorhexidina (CHX):

El tratamiento con clorhexidina produjo una reducción marcada en la riqueza taxonómica y alteró notablemente el perfil metabólico de la microbiota oral, especialmente hacia vías relacionadas con la recuperación energética. Estos resultados indican que la CHX ejerce un efecto disruptivo más amplio en comparación con las nanopartículas de cobre (NPCu), las cuales mantienen una mayor estabilidad y funcionalidad microbiana.

9. PROYECCIONES

Las proyecciones derivadas de esta investigación subrayan la necesidad de validar los resultados obtenidos en modelos clínicos humanos, con el propósito de evaluar la biocompatibilidad, eficacia y dosificación óptima de las nanopartículas de cobre (NPCu) en aplicaciones odontológicas, como el tratamiento de enfermedades periodontales, periimplantitis y la desinfección de conductos radiculares. Esta validación debe considerar factores propios del entorno oral humano, incluyendo la interacción con la saliva, dieta y hábitos orales, que no están presentes en los modelos animales utilizados. Asimismo, es prioritario profundizar en los mecanismos moleculares e inmunológicos mediante los cuales las NPCu modulan la microbiota oral y las rutas metabólicas funcionales. Para ello, será esencial incorporar herramientas ómicas como la transcriptómica, proteómica y metabolómica, además del uso de modelos in vitro que simulen de manera más fiel la mucosa oral humana. Otra línea relevante es el desarrollo de formulaciones combinadas que integren NPCu con agentes bioactivos como antiinflamatorios o probióticos, con el objetivo de potenciar su efecto antimicrobiano y reducir posibles efectos secundarios. Estas combinaciones deberán evaluarse rigurosamente, ya que pueden presentarse interacciones no deseadas que afecten la estabilidad, biodisponibilidad o reactividad de las nanopartículas. También se plantea la realización de estudios de biodistribución y toxicidad sistémica a largo plazo, con énfasis en la posible acumulación de cobre en tejidos no previamente analizados. Adicionalmente,

resulta necesario examinar los efectos sostenidos de las NPCu sobre el metabolismo sistémico y la composición microbiana, para determinar su rol en la restauración de la eubiosis oral y en la prevención de enfermedades relacionadas con la disbiosis. En el plano clínico, se proyecta la optimización de formulaciones diseñadas para actuar en nichos orales específicos como sacos periodontales, zonas periimplantarias o conductos radiculares, donde el acceso y la acción antimicrobiana son críticos. Estas formulaciones deberán ser evaluadas no solo en términos de eficacia antimicrobiana, sino también en su capacidad para favorecer la regeneración tisular y su compatibilidad con biomateriales utilizados en odontología.

10. GLOSARIO

ALT: Alanina aminotransferasa.

AST: Aspartato aminotransferasa.

CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media.

CHX: Clorhexidina.

CuO: Óxido de cobre.

EM: Expectation-Maximization (inglés) Algoritmo de maximización de expectativas.

Fosf. Alc: Fosfatasa alcalina.

GGT: Gamma-glutamyl transferasa.

NPCu: Nanopartículas de cobre.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONT: Oxford Nanopore Technology.

PT Total: Proteínas totales.

PVA: Polivinilalcohol.

PVP: Polivinilpirrolidona.

RDW-CV: Amplitud de distribución eritrocitaria.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SD: Desviación estándar.

VCM: Volumen corpuscular medio.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adeli, K., Raizman, J. E., Chen, Y., Higgins, V., Nieuwesteeg, M., Abdelhaleem, M., Wong, S. L., & Blais, D. (2015). Complex biological profile of hematologic markers across pediatric, adult, and geriatric ages: Establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clinical Chemistry*, *61*(8), 1075-1086. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.240531>
- Ahrari, F., Eslami, N., Rajabi, O., Ghazvini, K., & Barati, S. (2015). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dental Research Journal*, *12*(1), 44-49. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.150330>
- Alemán, C. L., Más, R. M., Rodeiro, I., Noa, M., Hernández, C., Menéndez, R., & Gámez, R. (1998). Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Laboratory Animals*, *32*(4), 457-466. <https://doi.org/10.1258/002367798780599802>
- Anderson, T. F. (1951). Techniques for the Preservation of Three-Dimensional Structure in Preparing Specimens for the Electron Microscope. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, *13*(4 Series II), 130-134. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1951.tb01007.x>

- Ashall, V., Morton, D., & Clutton, E. (2023). A Declaration of Helsinki for animals. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 50(4), 309-314. <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2023.03.005>
- Athanasopoulou, K., Boti, M. A., Adamopoulos, P. G., Skourou, P. C., & Scorilas, A. (2021). Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(1), 30. <https://doi.org/10.3390/life12010030>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541-555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Baker, J. L. (2022). Using Nanopore Sequencing to Obtain Complete Bacterial Genomes from Saliva Samples. *mSystems*, 7(5), e0049122. <https://doi.org/10.1128/msystems.00491-22>
- Baker, J. L. (2023). Illuminating the oral microbiome and its host interactions: Recent advancements in omics and bioinformatics technologies in the context of oral microbiome research. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(5), fuad051. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad051>
- Baker, J. L., Mark Welch, J. L., Kauffman, K. M., McLean, J. S., & He, X. (2024). The oral microbiome: Diversity, biogeography and human health. *Nature Reviews. Microbiology*, 22(2), 89-104. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00963-6>

- Berrio, M. E., Jerez-Olate, C., Ramírez, J. A., Saireddy, S., González-Rocha, G., Ponce, A., Meléndrez-Castro, M., & Sánchez-Sanhueza, G. (2024a). Novel Antibacterial and Biocompatible Nanostructured Gels Based on One-step Synthesis as a Potential Disinfectant for Endodontic Infection Control. *Journal of Endodontics*, *50*(1), 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2023.10.005>
- Berrio, M. E., Jerez-Olate, C., Ramírez, J. A., Saireddy, S., González-Rocha, G., Ponce, A., Meléndrez-Castro, M., & Sánchez-Sanhueza, G. (2024b). Novel Antibacterial and Biocompatible Nanostructured Gels Based on One-step Synthesis as a Potential Disinfectant for Endodontic Infection Control. *Journal of Endodontics*, *50*(1), 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2023.10.005>
- Bik, E. M., Long, C. D., Armitage, G. C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Gill, S. R., Fraser-Liggett, C. M., & Relman, D. A. (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *The ISME Journal*, *4*(8), 962-974. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.30>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(5), 320-330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Caplin, J. D., Granados, N. G., James, M. R., Montazami, R., & Hashemi, N. (2015). Microfluidic Organ-on-a-Chip Technology for Advancement of Drug

Development and Toxicology. *Advanced Healthcare Materials*, 4(10), 1426-1450. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500040>

Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., & Karp, P. D. (2016a). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D471-480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164>

Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., & Karp, P. D. (2016b). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D471-480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164>

Caspi, R., Billington, R., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, W. K., Paley, S., Subhraveti, P., & Karp, P. D. (2020a). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes—A 2019 update. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D445-D453. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz862>

Caspi, R., Billington, R., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, W. K., Paley, S., Subhraveti, P., & Karp, P. D. (2020b). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes—A 2019 update.

Nucleic Acids Research, 48(D1), D445-D453.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkz862>

Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 4(4), 303-306. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>

Charles River Laboratories. (2012). *Clinical pathology data for North American CD® (Sprague Dawley) rat colonies: January 2006 – December 2011* [Technical report]. Charles River Laboratories International, Inc. <https://azupcriversitestorage01.blob.core.windows.net/storage-account-container/Technical%20Resources/Clinical%20Pathology%20Data%20for%20North%20American%20CD%20Rat%20Colonies%20for%20January%202006%20-%20December%202011.pdf>

Chen, T., Yu, W.-H., Izard, J., Baranova, O. V., Lakshmanan, A., & Dewhirst, F. E. (2010). The Human Oral Microbiome Database: A web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database*, 2010, baq013. <https://doi.org/10.1093/database/baq013>

Cheng, X., He, F., Si, M., Sun, P., & Chen, Q. (2022a). Effects of Antibiotic Use on Saliva Antibody Content and Oral Microbiota in Sprague Dawley Rats. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 721691. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.721691>

- Cheng, X., He, F., Si, M., Sun, P., & Chen, Q. (2022b). Effects of Antibiotic Use on Saliva Antibody Content and Oral Microbiota in Sprague Dawley Rats. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 721691. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.721691>
- Chrisstop, V. V., Prilepskii, A. Y., Nikonorova, V. G., & Mironov, V. A. (2021). Nanosafety vs. nanotoxicology: Adequate animal models for testing in vivo toxicity of nanoparticles. *Toxicology*, *462*, 152952. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152952>
- Cieplik, F., Jakubovics, N. S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2019). Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria—Is There Cause for Concern? *Frontiers in Microbiology*, *10*, 587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00587>
- Collao, B., Morales, E. H., Gil, F., Polanco, R., Calderón, I. L., & Saavedra, C. P. (2012). Differential expression of the transcription factors MarA, Rob, and SoxS of *Salmonella Typhimurium* in response to sodium hypochlorite: Down-regulation of rob by MarA and SoxS. *Archives of Microbiology*, *194*(11), 933-942. <https://doi.org/10.1007/s00203-012-0828-8>
- Curry, K. D., Soriano, S., Nute, M. G., Villapol, S., Dilthey, A., & Treangen, T. J. (2024). Microbial Community Profiling Protocol with Full-length 16S rRNA Sequences and Emu. *Current Protocols*, *4*(3), e978. <https://doi.org/10.1002/cpz1.978>

- Curry, K. D., Wang, Q., Nute, M. G., Tyshaiyeva, A., Reeves, E., Soriano, S., Wu, Q., Graeber, E., Finzer, P., Mendling, W., Savidge, T., Villapol, S., Dilthey, A., & Treangen, T. J. (2022). Emu: Species-Level Microbial Community Profiling for Full-Length Nanopore 16S Reads. *Nature methods*, *19*(7), 845-853. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01520-4>
- Darby, I. (2022). Risk factors for periodontitis & peri-implantitis. *Periodontology* *2000*, *90*(1), 9-12. <https://doi.org/10.1111/prd.12447>
- Daxboeck, F., Gattringer, R., Mustafa, S., Bauer, C., & Assadian, O. (2005). Elevated serum alanine aminotransferase (ALT) levels in patients with serologically verified *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *11*(6), 507-510. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01154.x>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020a). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, *38*(6), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020b). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, *38*(6), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>

- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020c). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature biotechnology*, *38*(6), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Dudek-Wicher, R. K., Junka, A., & Bartoszewicz, M. (2018a). The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Przegląd Gastroenterologiczny*, *13*(2), 85-92. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.76005>
- Dudek-Wicher, R. K., Junka, A., & Bartoszewicz, M. (2018b). The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Przegląd Gastroenterologiczny*, *13*(2), 85-92. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.76005>
- Dufour, D. R., Lott, J. A., Nolte, F. S., Gretch, D. R., Koff, R. S., & Seeff, L. B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*, *46*(12), 2027-2049.
- Durán Almendárez, A. (2019). *Validación de la capacidad bactericida de aditivos basados en nanopartículas de cobre y plata para pinturas antivegetativas*. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/7990>
- Duran-Pinedo, A. E., & Frias-Lopez, J. (2015). Beyond microbial community composition: Functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes and Infection*, *17*(7), 505-516. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.03.014>

- Felig, P. (1973). The glucose-alanine cycle. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 22(2), 179-207. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(73\)90269-2](https://doi.org/10.1016/0026-0495(73)90269-2)
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., & Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223), 496-512. <https://doi.org/10.1126/science.7542800>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Foster, Z. S. L., Sharpton, T. J., & Grünwald, N. J. (2017). Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLOS Computational Biology*, 13(2), e1005404. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005404>
- Freire, M., Nelson, K. E., & Edlund, A. (2021). The Oral Host–Microbial Interactome: An Ecological Chronometer of Health? *Trends in Microbiology*, 29(6), 551-561. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.11.004>
- Fröhlich, E. (2018). Comparison of conventional and advanced in vitro models in the toxicity testing of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup2), 1091-1107. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1479709>

- Giknis, Mary L. A. & Clifford, Charles B. (2006). *Clinical laboratory parameters for Crl:CD(SD) rats* [Technical report]. Charles River Laboratories International, Inc.
https://azupcriversitestorage01.blob.core.windows.net/storage-account-container/Technical%20Resources/Clinical%20Laboratory%20Parameters%20for%20Crl-CD_SD_%20Rats%20-%20March%202006.pdf
- Gopinath, D., Pandiar, D., Li, Z., & Panda, S. (2024). Rodent models for oral microbiome research: Considerations and challenges- a mini review. *Frontiers in Oral Health*, 5. <https://doi.org/10.3389/froh.2024.1439091>
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 15(1), 30-44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
- Hajishengallis, G. (2023). Illuminating the oral microbiome and its host interactions: Animal models of disease. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(3), fuad018. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad018>
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 27(6), 409-419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
- Hans, M., Erbe, A., Mathews, S., Chen, Y., Solioz, M., & Mücklich, F. (2013). Role of copper oxides in contact killing of bacteria. *Langmuir: The ACS Journal*

of Surfaces and Colloids, 29(52), 16160-16166.

<https://doi.org/10.1021/la404091z>

He, Q., Su, G., Liu, K., Zhang, F., Jiang, Y., Gao, J., Liu, L., Jiang, Z., Jin, M., & Xie, H. (2017a). Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. *PloS One*, 12(12), e0189837.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189837>

He, Q., Su, G., Liu, K., Zhang, F., Jiang, Y., Gao, J., Liu, L., Jiang, Z., Jin, M., & Xie, H. (2017b). Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. *PLOS ONE*, 12(12), e0189837.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189837>

Honda, T., Honda, K., Kokubun, C., Nishimura, T., Hasegawa, M., Nishida, A., Inui, T., & Kitamura, K. (2008). Time-course changes of hematology and clinical chemistry values in pregnant rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 33(3), 375-380. <https://doi.org/10.2131/jts.33.375>

Hyde, E. R., Luk, B., Cron, S., Kusic, L., McCue, T., Bauch, T., Kaplan, H., Tribble, G., Petrosino, J. F., & Bryan, N. S. (2014a). Characterization of the rat oral microbiome and the effects of dietary nitrate. *Free Radical Biology and Medicine*, 77, 249-257.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.017>

- Hyde, E. R., Luk, B., Cron, S., Kusic, L., McCue, T., Bauch, T., Kaplan, H., Tribble, G., Petrosino, J. F., & Bryan, N. S. (2014b). Characterization of the rat oral microbiome and the effects of dietary nitrate. *Free Radical Biology & Medicine*, *77*, 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.017>
- Jain, M., Fiddes, I. T., Miga, K. H., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2015). Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. *Nature Methods*, *12*(4), 351-356. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3290>
- Jeong, J., Yun, K., Mun, S., Chung, W.-H., Choi, S.-Y., Nam, Y., Lim, M. Y., Hong, C. P., Park, C., Ahn, Y. J., & Han, K. (2021). The effect of taxonomic classification by full-length 16S rRNA sequencing with a synthetic long-read technology. *Scientific Reports*, *11*(1), 1727. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80826-9>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kadammatil, A. V., Sajankila, S. P., Prabhu, S., Rao, B. N., & Rao, B. S. S. (2018). Systemic Toxicity and Teratogenicity of Copper Oxide Nanoparticles and Copper Sulfate. *Journal of Nanoscience and*

Nanotechnology, 18(4), 2394-2404.

<https://doi.org/10.1166/jnn.2018.14542>

Kim, H. J., Kim, S. Y., Shin, S. P., Yang, Y. J., Bang, C. S., Baik, G. H., Kim, D. J., Ham, Y. L., Choi, E. Y., & Suk, K. T. (2020). Immunological measurement of aspartate/alanine aminotransferase in predicting liver fibrosis and inflammation. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 35(2), 320-330. <https://doi.org/10.3904/kjim.2018.214>

Kim, H. J., Oh, S. W., Kim, D. J., & Choi, E. Y. (2009). Abundance of immunologically active alanine aminotransferase in sera of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients. *Clinical Chemistry*, 55(5), 1022-1025. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.102996>

Kim, Y.-O., Park, S., Kim, H., Park, D.-S., Nam, B.-H., Kim, D.-G., & Yoon, J.-H. (2014). Halocynthiibacter namhaensis gen. Nov., sp. Nov., a novel alphaproteobacterium isolated from sea squirt Halocynthia roretzi. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(5), 881-889. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0142-3>

Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L.-I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., ... Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(7), 410-422. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>

- Lee, I.-C., Ko, J.-W., Park, S.-H., Shin, N.-R., Shin, I.-S., Moon, C., Kim, J.-H., Kim, H.-C., & Kim, J.-C. (2016). Comparative toxicity and biodistribution assessments in rats following subchronic oral exposure to copper nanoparticles and microparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, *13*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0169-x>
- Leger, A., & Leonardi, T. (2019). pycoQC, interactive quality control for Oxford Nanopore Sequencing. *Journal of Open Source Software*, *4*(34), 1236. <https://doi.org/10.21105/joss.01236>
- Levy, M., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2015). Metagenomic cross-talk: The regulatory interplay between immunogenomics and the microbiome. *Genome Medicine*, *7*(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0249-9>
- Li, Y., Zhu, M., Liu, Y., Luo, B., Cui, J., Huang, L., Chen, K., & Liu, Y. (2022). The oral microbiota and cardiometabolic health: A comprehensive review and emerging insights. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1010368. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1010368>
- Ma, X., Zhou, S., Xu, X., & Du, Q. (2022). Copper-containing nanoparticles: Mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review. *Frontiers in Surgery*, *9*, 905892. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.905892>
- Marxfeld, H. A., Küttler, K., Dammann, M., Gröters, S., & van Ravenzwaay, B. (2019). Body and organ weight data in 28-day toxicological studies in two

- mouse strains. *Data in Brief*, 27, 104632.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104632>
- Miller, D. P., Fitzsimonds, Z. R., & Lamont, R. J. (2019). Metabolic Signaling and Spatial Interactions in the Oral Polymicrobial Community. *Journal of Dental Research*, 98(12), 1308-1314. <https://doi.org/10.1177/0022034519866440>
- Morton, D. B. (2000). A Systematic Approach for Establishing Humane Endpoints. *ILAR Journal*, 41(2), 80-86. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.80>
- Morton, D. B., & Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *The Veterinary Record*, 116(16), 431-436.
<https://doi.org/10.1136/vr.116.16.431>
- Muir, P., Li, S., Lou, S., Wang, D., Spakowicz, D. J., Salichos, L., Zhang, J., Weinstock, G. M., Isaacs, F., Rozowsky, J., & Gerstein, M. (2016). The real cost of sequencing: Scaling computation to keep pace with data generation. *Genome Biology*, 17(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0917-0>
- Naito, M., Ogura, Y., Itoh, T., Shoji, M., Okamoto, M., Hayashi, T., & Nakayama, K. (2016). The complete genome sequencing of *Prevotella intermedia* strain OMA14 and a subsequent fine-scale, intra-species genomic comparison reveal an unusual amplification of conjugative and mobile transposons and identify a novel *Prevotella*-lineage-specific repeat. *DNA*

- Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 23(1), 11-19. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv032>
- OECD. (2022). *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>
- O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(Database issue), D733-D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(21), 3123-3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Pérez-Cobas, A. E., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2020). Metagenomic approaches in microbial ecology: An update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial Genomics*, 6(8), e000409. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409>

- Philip, J., Buijs, M. J., Pappalardo, V. Y., Crielaard, W., Brandt, B. W., & Zaura, E. (2022). The microbiome of dental and peri-implant subgingival plaque during peri-implant mucositis therapy: A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 49(1), 28-38. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13566>
- Pinto, M., Polania Zenner, P., Langer, T. M., Harrison, J., Simon, M., Varela, M. M., & Herndl, G. J. (2020). Putative degraders of low-density polyethylene-derived compounds are ubiquitous members of plastic-associated bacterial communities in the marine environment. *Environmental Microbiology*, 22(11), 4779-4793. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15232>
- Regueira-Iglesias, A., Balsa-Castro, C., Blanco-Pintos, T., & Tomás, I. (2023a). Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis. *Molecular Oral Microbiology*, 38(5), 347-399. <https://doi.org/10.1111/omi.12434>
- Regueira-Iglesias, A., Balsa-Castro, C., Blanco-Pintos, T., & Tomás, I. (2023b). Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis. *Molecular Oral Microbiology*, 38(5), 347-399. <https://doi.org/10.1111/omi.12434>
- Regueira-Iglesias, A., Vázquez-González, L., Balsa-Castro, C., Blanco-Pintos, T., Vila-Blanco, N., Carreira, M. J., & Tomás, I. (2023a). Impact of 16S rRNA Gene Redundancy and Primer Pair Selection on the Quantification and Classification of Oral Microbiota in Next-Generation Sequencing.

Microbiology Spectrum, 11(2), e0439822.

<https://doi.org/10.1128/spectrum.04398-22>

Regueira-Iglesias, A., Vázquez-González, L., Balsa-Castro, C., Blanco-Pintos, T., Vila-Blanco, N., Carreira, M. J., & Tomás, I. (2023b). Impact of 16S rRNA Gene Redundancy and Primer Pair Selection on the Quantification and Classification of Oral Microbiota in Next-Generation Sequencing.

Microbiology Spectrum, 11(2), e0439822.

<https://doi.org/10.1128/spectrum.04398-22>

Roberts, R. J., Carneiro, M. O., & Schatz, M. C. (2013). The advantages of SMRT sequencing. *Genome Biology*, 14(6), 405. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-405>

Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, ISSN 0213-005X, Vol. 22, Nº. 4, 2004, pags. 238-245, 22. <https://doi.org/10.1157/13059055>

Rodríguez-Pérez, H., Ciuffreda, L., & Flores, C. (2021). NanoCLUST: A species-level analysis of 16S rRNA nanopore sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(11), 1600-1601. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa900>

- Rosier, B. T., Buetas, E., Moya-Gonzalvez, E. M., Artacho, A., & Mira, A. (2020). Nitrate as a potential prebiotic for the oral microbiome. *Scientific Reports*, 10(1), 12895. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69931-x>
- Rosier, B. T., Takahashi, N., Zaura, E., Krom, B. P., Martínez-Espinosa, R. M., van Breda, S. G. J., Marsh, P. D., & Mira, A. (2022). The Importance of Nitrate Reduction for Oral Health. *Journal of Dental Research*, 101(8), 887-897. <https://doi.org/10.1177/00220345221080982>
- Sacoto-Figueroa, F. K., Bello-Toledo, H. M., González-Rocha, G. E., Luengo Machuca, L., Lima, C. A., Meléndrez-Castro, M., & Sánchez-Sanhueza, G. A. (2021). Molecular characterization and antibacterial activity of oral antibiotics and copper nanoparticles against endodontic pathogens commonly related to health care-associated infections. *Clinical Oral Investigations*, 25(12), 6729-6741. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03959-9>
- Samiei, M., Farjami, A., Dizaj, S. M., & Lotfipour, F. (2016). Nanoparticles for antimicrobial purposes in Endodontics: A systematic review of in vitro studies. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 58, 1269-1278. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.070>
- Santos, A., van Aerle, R., Barrientos, L., & Martinez-Urtaza, J. (2020). Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 296-305. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.01.005>

- Sato, Y., Yamagishi, J., Yamashita, R., Shinozaki, N., Ye, B., Yamada, T., Yamamoto, M., Nagasaki, M., & Tsuboi, A. (2015). Inter-Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra-Day Fluctuations in Individuals. *PLOS ONE*, *10*(6), e0131607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131607>
- Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S. V., & Kapila, Y. L. (2021a). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontology 2000*, *87*(1), 107-131. <https://doi.org/10.1111/prd.12393>
- Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S. V., & Kapila, Y. L. (2021b). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontology 2000*, *87*(1), 107-131. <https://doi.org/10.1111/prd.12393>
- Senior, J. R. (2012). Alanine aminotransferase: A clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *92*(3), 332-339. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.108>
- Shen, W., & Ren, H. (2021). TaxonKit: A practical and efficient NCBI taxonomy toolkit. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, *48*(9), 844-850. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.03.006>
- Shrestha, A., & Kishen, A. (2014). Antibiofilm efficacy of photosensitizer-functionalized bioactive nanoparticles on multispecies biofilm. *Journal of*

- Endodontics*, 40(10), 1604-1610.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.03.009>
- Shrestha, A., & Kishen, A. (2016). Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *Journal of Endodontics*, 42(10), 1417-1426.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.021>
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2013). Microbiology and Treatment of Acute Apical Abscesses. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 255-273.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00082-12>
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2022). Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *International Endodontic Journal*, 55 Suppl 3, 512-530. <https://doi.org/10.1111/iej.13677>
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., & Song, W. (2008). Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 55(3), 415-424.
<https://doi.org/10.1007/s00248-007-9287-1>
- Takahashi, N. (2015). Oral Microbiome Metabolism: From «Who Are They?» to «What Are They Doing?» *Journal of Dental Research*, 94(12), 1628-1637.
<https://doi.org/10.1177/0022034515606045>
- Tonetti, M. S., Bottenberg, P., Conrads, G., Eickholz, P., Heasman, P., Huysmans, M.-C., López, R., Madianos, P., Müller, F., Needleman, I., Nyvad, B., Preshaw, P. M., Pretty, I., Renvert, S., Schwendicke, F., Trombelli, L., van der Putten, G.-J., Vanobbergen, J., West, N., ... Paris,

- S. (2017). Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: Call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing - Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, *44 Suppl 18*, S135-S144. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12681>
- Valm, A. M. (2019). The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *Journal of molecular biology*, *431(16)*, 2957-2969. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.016>
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., ... Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science (New York, N.Y.)*, *304(5667)*, 66-74. <https://doi.org/10.1126/science.1093857>
- Wand, M. E., Bock, L. J., Bonney, L. C., & Sutton, J. M. (2017). Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61(1)*, e01162-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01162-16>

- Wang, J., Feng, J., Zhu, Y., Li, D., Wang, J., & Chi, W. (2022). Diversity and Biogeography of Human Oral Saliva Microbial Communities Revealed by the Earth Microbiome Project. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.931065>
- Wang, X., Li, Y., Feng, Y., Cheng, H., & Li, D. (2020). The role of macrophages in osseointegration of dental implants: An experimental study in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 108(11), 2206-2216. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36978>
- Weinroth, M. D., Belk, A. D., Dean, C., Noyes, N., Dittoe, D. K., Rothrock, M. J., Jr, Ricke, S. C., Myer, P. R., Henniger, M. T., Ramírez, G. A., Oakley, B. B., Summers, K. L., Miles, A. M., Ault-Seay, T. B., Yu, Z., Metcalf, J. L., & Wells, J. E. (2022). Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. *Journal of Animal Science*, 100(2), skab346. <https://doi.org/10.1093/jas/skab346>
- Wigand, J., Tansirichaiya, S., Winje, E., & Al-Haroni, M. (2021). Functional screening of a human saliva metagenomic DNA reveal novel resistance genes against sodium hypochlorite and chlorhexidine. *BMC Oral Health*, 21(1), 632. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-02000-5>
- Willis, J. R., & Gabaldón, T. (2020). The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms*, 8(2), 308. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308>

- Wirth, J. S., & Whitman, W. B. (2018). Phylogenomic analyses of a clade within the roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuariivita*, *Citreicella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal of six novel genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*(7), 2393-2411. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002833>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, *20*(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J. L., & Fan, B. (2014). Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics*, *40*(2), 285-290. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>
- Yadav, S., & Kapley, A. (2019). Exploration of activated sludge resistome using metagenomics. *The Science of the Total Environment*, *692*, 1155-1164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.267>
- Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L., & Radisic, M. (2018). Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nature Reviews Materials*, *3*(8), 257-278. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0034-7>
- Zhang, T., Li, H., Ma, S., Cao, J., Liao, H., Huang, Q., & Chen, W. (2023). The newest Oxford Nanopore R10.4.1 full-length 16S rRNA sequencing

enables the accurate resolution of species-level microbial community profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(10), e0060523. <https://doi.org/10.1128/aem.00605-23>

Zierk, J., Arzideh, F., Rechenauer, T., Haeckel, R., Rascher, W., Metzler, M., & Rauh, M. (2015). Age- and sex-specific dynamics in 22 hematologic and biochemical analytes from birth to adolescence. *Clinical Chemistry*, 61(7), 964-973. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239731>

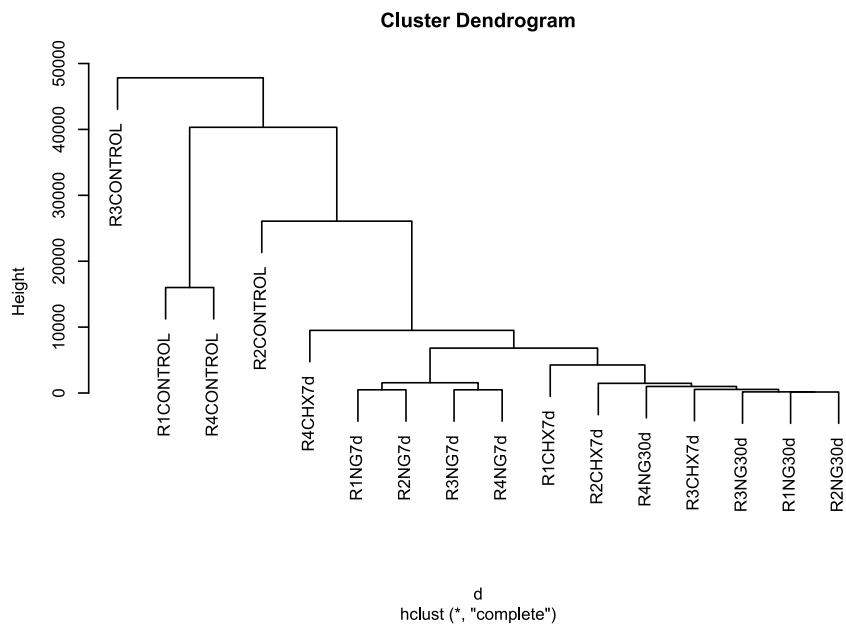


Figura 53. Análisis jerárquico de disimilitud. Dendrograma basado en distancias euclidianas generado mediante el método de enlace completo ('complete linkage'). Las muestras corresponden a los diferentes grupos de tratamiento. Las distancias reflejan las diferencias en las variables analizadas, agrupando las muestras según su similitud. Fuente: Elaboración propia.

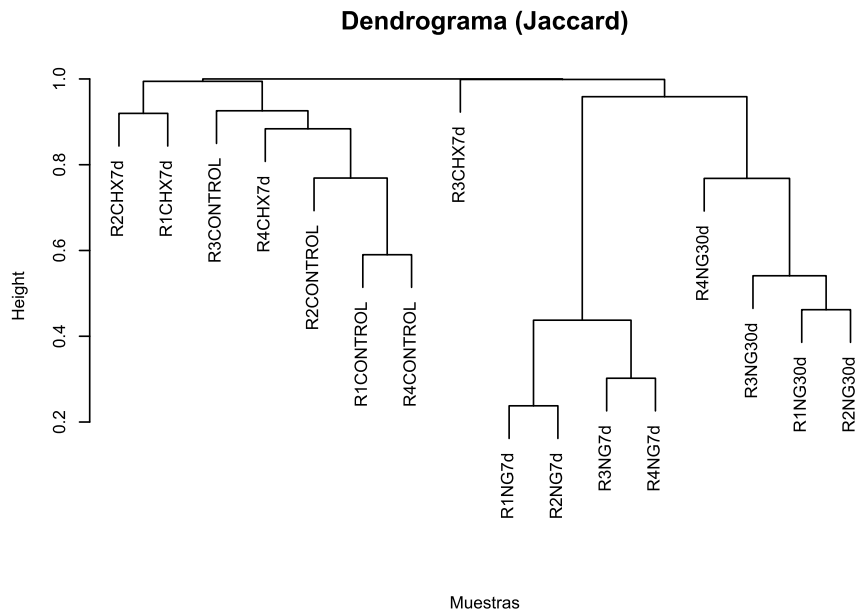


Figura 54. Análisis jerárquico de disimilitud. Dendrograma basado en el índice de similitud de Jaccard, utilizando el método de enlace completo ('complete linkage'). Las muestras corresponden a diferentes grupos de tratamiento. El dendrograma muestra el agrupamiento de las muestras según la similitud de sus perfiles taxonómicos. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 21. Representación de los 9 géneros más abundantes por grupo experimental, mostrando la abundancia total, la clasificación según tinción Gram y los requerimientos de oxígeno. Abreviaturas: FA, facultativo anaerobio; OA, obligado aerobio; MA, microaerófilico; OAn, obligado anaerobio. Fuente: Elaboración propia.

Group	Genus	Abundance	Gram	Ox. Req
CHX7d	<i>Streptococcus</i>	16844	Positivo	FA
CHX7d	<i>Rodentibacter</i>	8435	Negativo	FA
CHX7d	<i>Neisseria</i>	6649	Negativo	OA/MA
CHX7d	<i>Eikenella</i>	3471	Negativo	FA
CHX7d	<i>Rothia</i>	3447	Positivo	FA
CHX7d	<i>Haemophilus</i>	2335	Negativo	FA/MA
CHX7d	<i>Muribacter</i>	2327	Negativo	OAn
CHX7d	<i>Corynebacterium</i>	2052	Positivo	OA/FA
CHX7d	<i>Atopostipes</i>	1834	Positivo	FA
Control	<i>Streptococcus</i>	202537	Positivo	FA
Control	<i>Neisseria</i>	87676	Negativo	OA/MA
Control	<i>Rodentibacter</i>	68734	Negativo	FA
Control	<i>Eikenella</i>	30893	Negativo	FA
Control	<i>Corynebacterium</i>	28904	Positivo	OA/FA
Control	<i>Atopostipes</i>	23260	Positivo	FA
Control	<i>Cardiobacterium</i>	21165	Negativo	MA
Control	<i>Lysinibacillus</i>	19035	Positivo	OA
Control	<i>Rothia</i>	18209	Positivo	FA
NG30d	<i>Ruegeria</i>	1544	Negativo	OA
NG30d	<i>Halocynthiibacter</i>	1140	Negativo	OA
NG30d	<i>Cognatiyoonia</i>	985	Negativo	OA
NG30d	<i>Octadecabacter</i>	959	Negativo	OA
NG30d	<i>Tenacibaculum</i>	797	Negativo	OA
NG30d	<i>Nereida</i>	622	Negativo	OA
NG30d	<i>Phaeobacter</i>	557	Negativo	OA
NG30d	<i>Yoonia</i>	397	Negativo	OA
NG30d	<i>Falsihalocynthiibacter</i>	345	Negativo	OA
NG7d	<i>Ruegeria</i>	12123	Negativo	OA
NG7d	<i>Halocynthiibacter</i>	8645	Negativo	OA
NG7d	<i>Cognatiyoonia</i>	8250	Negativo	OA
NG7d	<i>Octadecabacter</i>	6045	Negativo	OA
NG7d	<i>Tenacibaculum</i>	5987	Negativo	OA
NG7d	<i>Nereida</i>	5410	Negativo	OA
NG7d	<i>Phaeobacter</i>	4367	Negativo	OA
NG7d	<i>Yoonia</i>	3249	Negativo	OA
NG7d	<i>Falsihalocynthiibacter</i>	2934	Negativo	OA

Tabla 22. Distribución porcentual de la clasificación Gram en función de la abundancia total por grupo experimental. Count: Número de géneros clasificados en cada categoría Gram, Sum. abundance: Suma de la abundancia total de los géneros de cada categoría, Tot. Abundance group: Abundancia total registrada para el grupo experimental, Abundance percent: Porcentaje que representa la suma de abundancia de cada categoría respecto a la abundancia total del grupo. Fuente: Elaboración propia.

Group	Gram	Count	Sum. abundance	Tot. Abundance group	Abundance percent
CHX7d	Negative	54	21147	51617	40,9 %
CHX7d	Positive	46	30470	51617	59,03 %
CONTROL	Negative	35	208890	574623	36,3 %
CONTROL	Positive	51	365733	574623	63,6 %
NG30d	Negative	40	7155	7378	96,9 %
NG30d	Positive	2	223	7378	3,02 %
NG7d	Negative	80	57729	58489	98,7 %
NG7d	Positive	5	760	58489	1,29 %

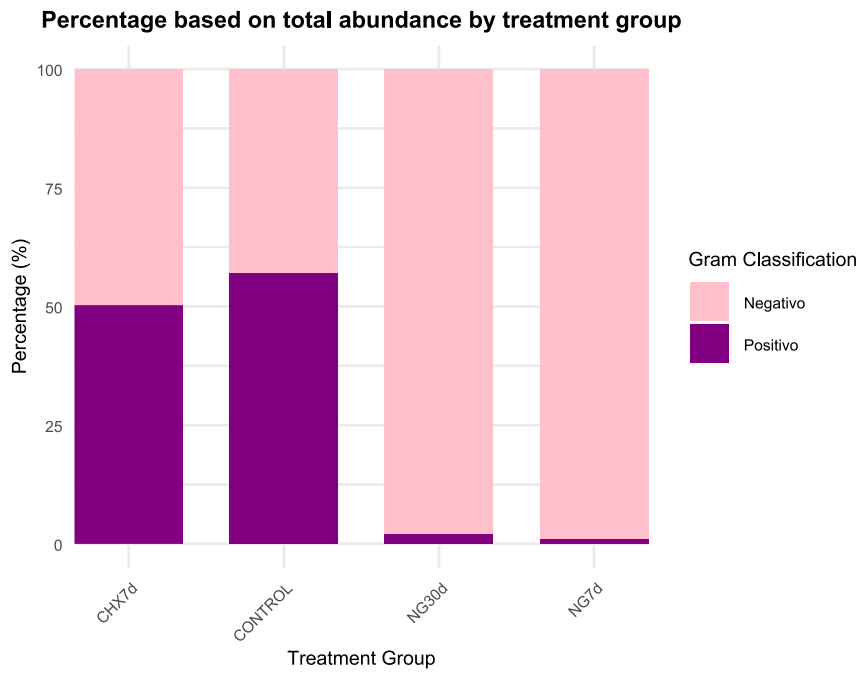


Figura 55. Distribución porcentual de bacterias Gram positivas y Gram negativas en la microbiota oral de ratas Sprague-Dawley según el grupo de tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 23. Índices de diversidad alfa para cada una de las muestras experimentales de microbiota oral de ratas tratadas. Se presentan los valores de riqueza observada (Richness), riqueza estimada mediante el índice Chao1 , índice de Simpson, índice de Shannon y equidad (Evenness). Fuente: Elaboración propia.

Richness	Simpson	Shannon	Evenness	chao1	Barcode
42	0,92760074	3,06350354	0,8196293	42	BC24
102	0,96967895	4,0450704	0,87461496	160,8	BC07
105	0,96856755	3,9117512	0,84052096	105	BC08
92	0,95345607	3,66173845	0,80979869	92	BC09
157	0,97805953	4,36098875	0,8624954	157	BC16
96	0,95893418	3,73539104	0,81838433	96	BC17
106	0,9601297	3,81174762	0,81736837	106	BC18
128	0,96032148	3,94633243	0,81333632	128	BC19
132	0,95886169	3,93443423	0,80577388	132	BC10
137	0,96367953	4,0425124	0,82165205	137	BC12
143	0,96543473	4,09297544	0,82472367	143	BC14
40	0,95128514	3,36313766	0,91169628	40	BC15
44	0,95445247	3,45608838	0,91329683	44	BC20
41	0,95495129	3,4138783	0,91929771	41	BC21
80	0,96655036	3,89498642	0,88885503	80	BC22
109	0,96221689	3,80339017	0,81072439	109	BC23

Tabla 24. Valores promedio, número de muestras (N) y rangos de referencia para parámetros hematológicos en ratas Sprague-Dawley machos de 8 a 12 semanas de edad, obtenidos del laboratorio Charles River. Estos datos representan los intervalos fisiológicos normales utilizados como estándar para la interpretación de resultados experimentales. Fuente: Elaboración propia.

Variable (Unidad)	N	Media	Rango
Eritrocitos ($10^6/\mu\text{l}$)	549	7.96	7.77 - 8.19
Hematocrito (%)	549	43.93	41.20 - 47.30
Hemoglobina (g/dl)	549	15.07	14.40 - 16.00
MCHC (%)	544	34.38	32.70 - 35.70
MCH (pg)	544	18.96	18.30 - 20.00
MCV (fl)	544	55.17	53.00 - 59.50
Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	549	11.57	10.09 - 14.01
Neutrófilos (%)	529	9.89	8.20 - 14.50
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	529	1.18	0.91 - 1.70
Linfocitos (%)	529	84.39	80.20 - 86.00
Linfocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	529	9.73	8.50 - 12.10
Monocitos (%)	529	2.58	2.10 - 3.40
Monocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	529	0.28	0.10 - 0.46
Eosinófilos (%)	529	1.20	1.00 - 1.50
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	529	0.13	0.10 - 0.16
Basófilos (%)	529	0.48	0.30 - 1.00
Basófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	529	0.05	0.00 - 0.10
Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)	260	792.0	379 - 967

Tabla 25. Valores promedio, número de muestras (N) y rangos de referencia para parámetros hematológicos en ratas Sprague-Dawley machos de 8 a 12 semanas de edad, obtenidos del laboratorio Charles River. Fuente: Elaboración propia.

Variable (Unidad)	N	Media	Rango
Proteína Total (g/dl)	723	6.16	5.90 - 6.60
Relación A/G	693	1.42	1.10 - 2.70
Albumina (g/dl)	724	3.59	3.30 - 4.60
Fosfatasa Alcalina (UI/l)	719	160.0	136.00 - 188.00
Bilirrubina Total (mg/dl)	723	0.55	0.10 - 1.00
Nitrógeno Uréico (mg/dl)	724	14.3	13.00 - 16.00
Creatinina (mg/dl)	724	0.54	0.50 - 0.60
Glucosa (mg/dl)	724	146.3	112.00 - 176.00
ALT (UI/l)	725	34.4	28.00 - 40.00
AST (UI/l)	725	100.6	87.00 - 114.00
Creatina Quinasa (UI/l)	724	362.0	344.00 - 380.00
Lactato Deshidrogenasa (UI/l)	724	389.0	360.00 - 418.00
GGT (UI/l)	579	0.5	0.00 - 1.00
Calcio (mg/dl)	718	10.04	9.40 - 11.00
Cloruro (meq/l)	720	104.0	102.00 - 105.00
Fósforo (mg/dl)	672	8.11	7.30 - 10.00
Potasio (meq/l)	725	5.15	4.70 - 6.20
Sodio (meq/l)	725	144.0	141.00 - 150.00
Colesterol total (mg/dl)	709	61.7	54.00 - 74.00
Triglicéridos (mg/dl)	653	73.0	61.00 - 99.00