

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Odontología

MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Efecto del extracto natural de arándano rojo en la formación de un *biofilm* y en la viabilidad bacteriana en un modelo validado de *biofilm* oral *in vitro*

AUTOR

David Miguel Simões e Martins

TUTOR

Prof. Doctor David Herrera González

Madrid, junio 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Odontología

MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Efecto del extracto natural de arándano rojo en la formación de un *biofilm* y en la viabilidad bacteriana en un modelo validado de *biofilm* oral *in vitro*

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS PRESENTADA POR:

David Miguel Simões e Martins

TUTOR:

Prof. Doctor David Herrera González

Madrid, junio 2018



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
VISTO BUENO DEL TUTOR
MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:	David Herrera González
---------------------	------------------------

del alumno/a

Nombre y apellidos	David Miguel Simões e Martins
--------------------	-------------------------------

enunciado en la línea de investigación

“Evaluación del efecto de polifenoles procedentes de productos naturales frente a patógenos orales en un modelo de <i>biofilm</i> subgingival”
--

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

“Efecto del extracto natural de arándano rojo en la formación de un <i>biofilm</i> y en la viabilidad bacteriana en un modelo validado de <i>biofilm</i> oral <i>in vitro</i> ”

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid, a 5 de junio de 2019.

Fdo: el profesor/a



El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel



MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)

CENTRO: Facultad de Odontología

ESTUDIANTE DE MÁSTER: David Miguel Simões e Martins

TUTOR/ES DEL TFM: David Herrera González

TÍTULO DEL TFM: “Efecto del extracto natural de arándano rojo en la formación de un *biofilm* y en la viabilidad bacteriana en un modelo validado de *biofilm* oral *in vitro*”

FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA: 22 de junio de 2018

FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA (en caso de producirse): -

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en Ciencias Odontológicas y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

2. Colaboración mutua

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones

de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

3. Normativa

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

4. Obligaciones del estudiante de Máster

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

5. Obligaciones del tutor/es del TFM

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

6. Buenas prácticas

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

8. Confidencialidad

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

9. Propiedad intelectual e industrial

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

10. Periodo de Vigencia

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

Firmado en Madrid, a 5 de junio de 2019

El estudiante de Máster	El Tutor/es
David Miguel Simões e Martins	David Herrera González
Fdo.:	Fdo.:

SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. David Miguel Simões e Martins con NIF 224512153, estudiante de Máster en la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2018 -2019, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado “Efecto del extracto natural de arándano rojo en la formación de un *biofilm* y en la viabilidad bacteriana en un modelo validado de *biofilm* oral *in vitro*” y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/es/son:

David Herrera González

DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente.

De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 5 de junio de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.

“Todos nuestros sueños pueden hacerse realidad, si tenemos el coraje de perseguirlos.”

WALT DISNEY

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, **Dr. David Herrera**, por todas sus enseñanzas, simpatía y paciencia a lo largo de este curso académico. Gracias por haberme permitido formar parte del excelente grupo de investigación que ha llevado a cabo esta investigación. Le estaré eternamente agradecido por todo lo que he vivido, aprendido y disfrutado, entre las clases del Máster de Periodoncia y el Laboratorio de Investigación.

A mi guía en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, **Dra. María Sánchez**, le estoy inmensamente agradecido por todo lo que me ha enseñado, por mostrarme la belleza de la Microbiología asociada a la Periodoncia y por contagiarme con el placer de investigar en el laboratorio y por publicar nuestros resultados. Además, me gustaría darle las gracias por su apoyo incondicional, amistad, cercanía y por todos sus consejos y palabras de aliento. ¡Haberle conocido marcará indudablemente mi trayectoria como futuro investigador! Muchas gracias por todo.

Al doctorando y gran amigo portugués **Honorato Ribeiro-Vidal**, por ser incansable conmigo, por sus consejos amigos y por ser un ejemplo de estudiante, periodoncista y de persona. Mi trayecto desde el ICS-Viseu de la *Universidade Católica Portuguesa* hasta la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en gran parte se debe a él y, por tanto, le estoy muy agradecido por haberme guiado siempre hacia los mejores caminos. Espero que continuemos sumando conquistas juntos en el mundo de la Periodoncia. *Obrigado por tudo, do fundo do coração!*

A **Dr. Mariano Sanz**, **Dr. David Herrera** y **Dra. Elena Figuero**, por brindarme la oportunidad de aprender de grandes maestros, de los mejores expertos en Periodoncia a nivel mundial, en el Master de Periodoncia, y por haberme involucrado como colaborador en el excelente grupo de investigación ETEP. Han sido cerca de diez meses intensísimos, duros y exigentes, sin embargo, cada segundo que he vivido aquí ha merecido la pena. He evolucionado y he aprendido muchísimo de Metodología de Investigación y de Periodoncia, como nunca he pensado que sería posible en tan poco tiempo.

Esto solo ha sido posible porque estoy cerca de grandes maestros, profesionales y personas. La exigencia, los valores, la pasión y el ánimo diario que nos transmiten por la Periodoncia y por la Investigación transforma todo lo que pensábamos que sería imposible en posible. ¡Termino diciéndoles que es un placer, un orgullo y un honor ser vuestro estudiante!

A mi querida familia, mi núcleo duro, por hacer posible todo mi trayecto académico hasta aquí, por confiar en mi, por quererme, por estar tan orgullosos de mi y por estar siempre presentes en los buenos momentos y en los menos buenos. Sin ellos, no sería la persona y el estudiante que soy hoy en día. A ellos les debo todo y los llevo en mi corazón. ¡Muchas gracias por todo!

A **Luís Azevedo**, un gran compañero que la Odontología me dio. Desde hace 6 años tengo la suerte de tener tu buena amistad y estoy seguro de que sumaremos muchos más compartiendo bonitas historias, conquistas y experiencias. *Muito obrigado por tudo, de verdade!*

A **Andrea Alonso**, por todo lo que hemos vivido juntos este curso académico, en el Máster en Ciencias Odontológicas, en el Experto en Clínica Periodontal y en el Laboratorio de Investigación. Eres una excelente amiga, un apoyo sin igual en periodoncia y una grandísima maestra de español. Sin tu ayuda, paciencia e incansable disponibilidad no me habría integrado tan bien en la Facultad y no habría desarrollado mi español como lo he hecho. Es incalculable todo lo que has hecho por mí. ¡Un “gracias” es poco! Te estaré eternamente agradecido ...

RESUMEN

Objetivos

Investigaciones previas han demostrado la capacidad antimicrobiana de los extractos de arándano rojo frente a varios patógenos periodontales en estado planctónico. No obstante, la literatura existente sobre ese efecto en patógenos periodontales organizados en *biofilm in vitro* es escasa. Debido a que las bacterias se organizan en *biofilms* en la cavidad oral, el objetivo de este estudio es evaluar la actividad antibacteriana y el potencial anti-adhesión para la formación de *biofilms* del extracto de arándano rojo frente a *Streptococcus oralis*, *Veillonela parvula*, *Actinomyces naeslundii* y los patógenos periodontales *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, en un modelo validado de *biofilm in vitro*.

Materiales y métodos

Se estudiaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs, por sus siglas en inglés) y las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs, por sus siglas en inglés) de 6 especies bacterianas en planctónico, tras un periodo de exposición de 24-48 horas a diferentes concentraciones de extractos de arándano rojo (1.000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 100 µg/mL y 10 µg/mL). Dichas especies bacterianas están implicadas en el desarrollo del *biofilm* oral subgingival *in vivo* y, como tal, representan los colonizadores iniciales (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y los colonizadores tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*).

Teniendo en cuenta las MBCs de las seis especies bacterianas, se utilizó un modelo validado de *biofilm in vitro*, para evaluar la actividad antibacteriana de una solución de extractos de arándano rojo (20.000 µg/mL), frente a las bacterias organizadas en *biofilm*, en dos tiempos de exposición (30 y 60 segundos).

Teniendo en cuenta las MICs de las seis especies bacterianas, se analizó el potencial inhibitorio en la formación de *biofilms* sobre discos de

hidroxiapatita (HA), de una solución de extractos de arándano rojo (200 µg/mL), tras 6 horas de contacto.

En los tres experimentos, se estudió el recuento de las bacterias, expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés). La vitalidad celular de los *biofilms* fue evaluada por microscopía de barrido laser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés).

En el segundo y tercer experimentos, las variables dependientes seleccionadas fueron las UFC/mL viables de las seis bacterianas y la proporción de células vivas/células muertas de todo el *biofilm*. Se realizó un análisis a nivel del experimento para cada parámetro del estudio (n=9 para qPCR y n=3 para los resultados de CLSM). Para evaluar la normalidad de la distribución de los datos se usó el test de *Shapiro-Wilk*. El efecto de cada solución y el tiempo de exposición (variables independientes) y su interacción con las variables dependientes, se evaluó mediante el test paramétrico ANOVA. Se construyó un modelo lineal general, utilizándose el método de máxima verosimilitud y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos se expresaron como medias ± desviación estándar y como el porcentaje medio de inhibición. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p < 0,05$.

Resultados

Con respecto a la capacidad antibacteriana, los extractos de arándano rojo (20.000 µg/mL) provocaron reducciones estadísticamente significativas en las UFC/mL viables de *S. oralis* y *A. naeslundii*, en el modelo de *biofilm in vitro*, tras 30 y 60 segundos de exposición y frente a *V. parvula*, a los 30 segundos de exposición. Sin embargo, aunque su efecto redujo la viabilidad de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*, el efecto no fue estadísticamente significativo tras 30 y 60 segundos de exposición. Solo en el caso de *F. nucleatum* se observaron diferencias estadísticamente significativas en las UFC/mL viables, cuando se compararon los dos tiempos de exposición.

En relación a la capacidad *antibiofilm*, los extractos de arándano rojo (200 µg/mL) inhibieron significativamente la incorporación de las seis especies bacterianas en el modelo de *biofilm in vitro*, tras 6 horas de exposición, en comparación con los *biofilms* control (exposición a PBS). Tras el análisis de CLSM, se confirmó que los *biofilms* formados en la superficie de los discos de HA no estaban tan bien estructurados como los *biofilms* control, detectándose también reducciones significativas en la biomasa y en el número de colonias bacterianas en los *biofilms* tratados mediante qPCR.

Conclusiones

El extracto natural de arándano rojo presenta capacidad antibacteriana frente a seis especies bacterianas (*S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii* y los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*) organizadas en *biofilm*, de manera significativa frente a los colonizadores iniciales, y capacidad para inhibir la incorporación de las seis especies bacterianas en un *biofilm in vitro*.

Palabras clave: arándano rojo; enfermedades periodontales; *biofilms* dentales; *P. gingivalis*; *A. actinomycetemcomitans*; *F. nucleatum*.

ABSTRACT

Aim

Previous studies have demonstrated the antimicrobial capacity of cranberry extracts against several periodontal pathogens in planktonic state. However, the literature about this effect on periodontal pathogens organized in *in vitro* biofilms is scarce. Since bacteria are organized in biofilms in the oral cavity, the objective of this study was to evaluate the antibacterial activity and the antiadhesion potential for biofilm formation of cranberry extract against *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii* and the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum*, in a validated *in vitro* biofilm model.

Material and methods

Minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of 6 bacterial species in planktonic state were studied after 24-48 hours of exposure at different concentrations of cranberry extracts (1.000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL and 10 µg/mL). These bacterial species are involved in the development of an *in vivo* subgingival oral biofilm, and represent the early colonizers (*S. oralis* and *A. naeslundii*), early (*V. parvula*), secondary (*F. nucleatum*) and late colonizers (*P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*).

Based on the MBCs of the six bacterial species, a validated *in vitro* biofilm model was used to evaluate the antibacterial activity of a solution of cranberry extracts (20,000 µg/mL) against bacteria in biofilm, in two exposure times (30 and 60 seconds).

Based on the MICs of the six bacterial species, it was analysed the inhibitory potential on the formation of biofilms on hydroxyapatite (HA) discs of a solution of cranberry extracts (200 µg/mL) after 6 hours of exposure.

In the three experiments, the bacterial counts, expressed as colony forming units per milliliter (CFU/mL), was studied using the real-time

quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique. Cellular vitality of the biofilms was evaluated by confocal laser scanning microscopy (CLSM).

In the second and third experiments, the dependent variables selected were the viable CFU/mL of the six bacterial species and the ratio of living cells/dead cells of the entire biofilm. An experiment-level analysis was made for each study parameter (n=9 for qPCR and n=3 for the results of CLSM). To evaluate the normality of the data distribution, the Shapiro-Wilk test was used. The effect of each solution and the exposure time (independent variables) and its interaction with the dependent variables were evaluated by the parametric ANOVA test. A general linear model was constructed, using the maximum likelihood method and the Bonferroni corrections for multiple comparisons. The data were expressed as means \pm standard deviation and as mean percentage of inhibition. The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

With respect to the antibacterial capacity, cranberry extracts (20.000 $\mu\text{g/mL}$) caused significant reductions on viable CFU/mL of *S. oralis* and *A. naeslundii*, in an *in vitro* biofilm model, after 30 and 60 seconds of exposition and against of *V. parvula*, at 30 seconds of exposure. However, although their effect reduced the viability of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum*, their effect was not significant after 30 and 60 seconds of exposure. Only for *F. nucleatum*, statistically significant differences were observed in the viable CFU/mL when the two exposure times were compared.

In relation to the antibiofilm capacity, cranberry extracts (200 $\mu\text{g/mL}$) significantly inhibited the incorporation of the six bacterial species in the *in vitro* biofilm model after 6 hours of exposure, in comparison with the control biofilms. After CLSM analysis, it was confirmed that the biofilms formed on the surface of the HA discs were not as well structured as the control biofilms, and significant reductions in the biomass and in the number of bacterial colonies in the biofilms treated by qPCR were also detected.

Conclusions

Natural extracts of cranberry present antibacterial capacity against six bacterial species (*S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii* and the periodontal pathogens *P. gingivalis*, *A. actinomycescomitans* and *F. nucleatum*) in biofilm, with a statistically significant result against the initial colonizers, and an ability to inhibit the incorporation of the six bacterial species in an *in vitro* biofilm.

Key words: cranberry; periodontal diseases; dental biofilms; *P. gingivalis*; *A. actinomycescomitans*; *F. nucleatum*.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	XV
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. OBJETIVOS GENERALES	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. HIPÓTESIS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1. EXTRACTO NATURAL DE ARÁNDANO ROJO	9
4.2. CEPAS UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	9
4.3. EXPERIMENTOS SOBRE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE ARÁNDANO ROJO	11
4.3.1. Efecto antibacteriano frente a las bacterias en planctónico	11
4.3.2. Efecto en la viabilidad bacteriana en un modelo de <i>biofilm</i> oral <i>in vitro</i>	12
4.4. EFECTO SOBRE LA ADHESIÓN BACTERIANA <i>IN VITRO</i>	15
4.5. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	16
4.6. ANÁLISIS DE LOS <i>BIOFILMS</i> POR CLSM	18
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
5. RESULTADOS	23
5.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE ARÁNDANO ROJO	23
5.1.1. MIC y MBC de las especies bacterianas en planctónico	23
5.1.2. Efecto antibacteriano en el modelo de <i>biofilm in vitro</i>	23
5.2. EFECTO INHIBITORIO DE LOS EXTRACTOS DE ARÁNDANO ROJO EN LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM IN VITRO</i>	28
6. DISCUSIÓN	33
7. CONCLUSIÓN	41
8. BIBLIOGRAFÍA	43
9. APÉNDICES	53
9.1. DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ESTA INVESTIGACIÓN	53
9.1.1. Poster en congresos nacionales	53
9.1.2. Comunicaciones orales en congresos nacionales e internacionales	53
9.2. ABREVIATURAS	55
9.3. ÍNDICE DE TABLAS	56
9.4. ÍNDICE DE FIGURAS	57

1. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad crónica multifactorial de origen inflamatorio asociada con la presencia de un *biofilm* bacteriano disbiótico, caracterizada por la destrucción progresiva de los tejidos periodontales de soporte. Sus manifestaciones primarias incluyen la pérdida de inserción clínica y reabsorción del hueso alveolar, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (Papapanou *et al.*, 2018), pudiendo conllevar, en última instancia, a la pérdida del diente (Lang & Lindhe, 2015).

Según Pihlstrom *et al.*, (2005) la caries dental y la periodontitis son enfermedades bucales muy prevalentes, siendo estas las causas principales de la pérdida dental. Así mismo, Frencken *et al.*, (2017) afirman que la periodontitis es la sexta patología más común a nivel mundial. A partir de los 30 años, el 47 % de los adultos presentan periodontitis, mientras que, en sujetos de más de 65 años, esta cifra asciende hasta un 85% (Eke *et al.*, 2012, Chung *et al.*, 2011).

Aunque la mayoría de los microorganismos que colonizan los dientes, tanto a nivel supra como subgingival, son compatibles con la salud periodontal (Beikler & Flemmig, 2011), hay un grupo de especies bacterianas patógenas presentes en el *biofilm* dental (incluyendo *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) que son el factor etiológico primario de las enfermedades periodontales (Teles *et al.*, 2013, Socransky & Haffajee, 2002, Davey & Costerton, 2006, Socransky & Haffajee, 2005, Marsh, 1994, Marsh, 2005), las cuales tienen un impacto importante tanto en la cavidad oral, como en la salud sistémica (Tonetti *et al.*, 2013) y en los indicadores de calidad de vida (Buset *et al.*, 2016).

En este sentido, se busca tratar las enfermedades periodontales, en una primera fase, mediante instrumentación manual o mecánica, para reducir la carga bacteriana en la cavidad oral. Además, se utilizan estrategias antimicrobianas complementarias, como antibióticos locales y/o sistémicos o antimicrobianos no específicos, por ejemplo, para aumentar los efectos antimicrobianos del desbridamiento mecánico (Kramer *et al.*, 2010).

Debido a la naturaleza infecciosa de las enfermedades periodontales, son ampliamente usadas sustancias antimicrobianas en el manejo (prevención y

tratamiento) de las mismas enfermedades periodontales (Herrera *et al.*, 2008, Serrano *et al.*, 2015). Sin embargo, están siendo reportados numerosos efectos adversos asociados a estas estrategias de tratamiento (Dabholkar *et al.*, 2016, Muller *et al.*, 2017), como el aumento preocupante de la resistencia antibiótica de los patógenos periodontales (Van Winkelhoff *et al.*, 2005), una vez que representan una amenaza para la salud pública mundial y un importante problema económico (Barbieri *et al.*, 2017), así como los efectos secundarios de los compuestos antisépticos/ antimicrobianos (Herrera *et al.*, 2008, Serrano *et al.*, 2015). De hecho, se enfatiza la necesidad de buscar nuevos abordajes para el tratamiento y prevención de las enfermedades periodontales y se realza la necesidad de buscar, desarrollar y mejorar los compuestos antimicrobianos naturales capaces de inhibir la proliferación de los patógenos bacterianos (Van Winkelhoff, 2012, Van Strydonck *et al.*, 2012, Serrano *et al.*, 2015, Rams *et al.*, 2014). Por otro lado, también se están buscando nuevas estrategias antibacterianas, como, por ejemplo, el control de las enfermedades infecciosas utilizándose principios activos que actúen en los mecanismos de adhesión bacteriana (Eydelnant & Tufenkji, 2008, Feldman *et al.*, 2012).

En esta búsqueda por compuestos antibacterianos alternativos, surgen los polifenoles. Estos forman parte de un gran grupo de compuestos químicos, denominado fitoquímicos, que están presentes en las plantas, confiriéndole color, sabor, aroma y textura. Estos compuestos se han desarrollado a lo largo de miles de años de evolución para defender a los organismos de los efectos de los radicales libres, virus, bacterias y hongos. Además, los fitoquímicos son capaces de dañar la membrana bacteriana, de suprimir algunos factores de virulencia (enzimas y toxinas) y de inhibir la formación de *biofilms* bacterianos (Barbieri *et al.*, 2017).

Los polifenoles son productos naturales, que tienen una estructura compleja y presentan más de 8000 compuestos identificados hasta hoy. Los mismos se pueden encontrar en grandes cantidades en frutas, verduras, nueces, semillas, tallos, flores y bebidas como el café, el té y el vino tinto (Barbieri *et al.*, 2017). Su clasificación se basa principalmente en sus respectivos compuestos químicos (Hussain *et al.*, 2016). Algunos autores clasifican los polifenoles en cinco grandes grupos - taninos hidrolizables, ácidos fenólicos, amidas

polifenólicas, flavonoides y otros, con sus subgrupos correspondientes (Figura 1) (Tsao, 2010, Lima *et al.*, 2014).

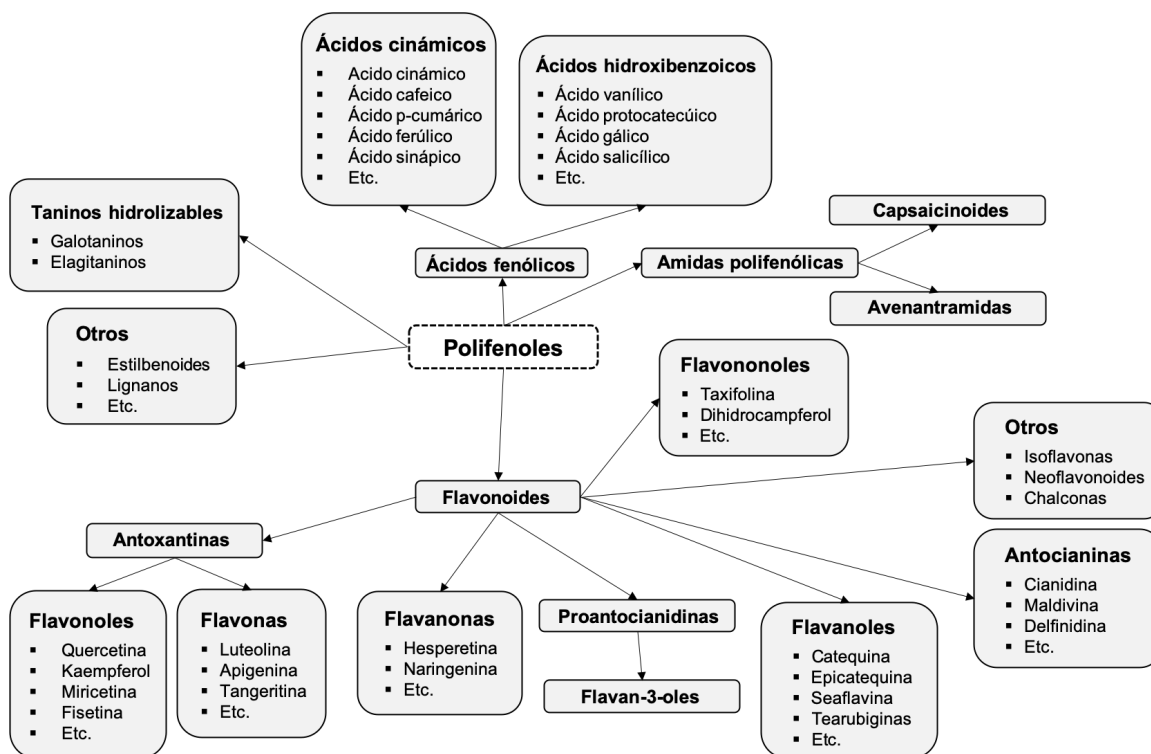


Figura 1 - Clasificación de los polifenoles y sus compuestos representativos. Adaptado de Bunte *et al.*, (2019).

Según una revisión sistemática reciente, los flavonoides, especialmente las proantocianidinas y los flavan-3-oles, parecen ser los compuestos con resultados más prometedores en la prevención o en el tratamiento de las enfermedades periodontales (Bunte *et al.*, 2019).

El mayor grupo de polifenoles es el de los flavonoides, los cuales se dividen en siete subgrupos. Los mismos comparten una estructura común, que consta de dos anillos aromáticos (A y B) y tres átomos de carbono que se unen entre los anillos A y B, creando un heterociclo oxigenado denominado anillo C (Figura 2) (Manach *et al.*, 2004).

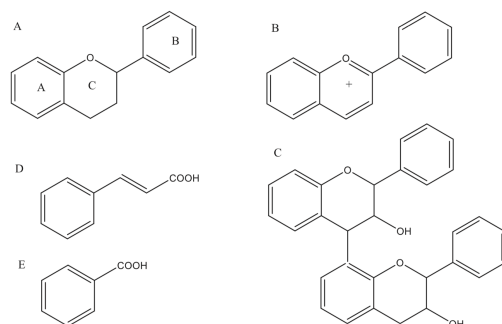


Figura 2 – Características de la estructura química de los flavonoides (A), antocianidinas (B), proantocianidinas (C), ácido cinámico (D) y derivados del ácido benzoico (E). Tomado de Bunte *et al.*, (2019).

En estudios previos, ha sido demostrado que los polifenoles y otros componentes de plantas tienen una influencia en la microbiota humana, o por la promoción del crecimiento de microorganismos benéficos o por la actuación contra patógenos (Gutiérrez *et al.*, 2017). Se ha descrito que los polifenoles del arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*) inhiben selectivamente el crecimiento de los patógenos intestinales, tales como las cepas de *Staphylococcus* y de *Salmonella entérica* (Gyawali & Ibrahim, 2012); reducen la colonización de *Escherichia coli* en el tracto urinario (Sun *et al.*, 2015, Jensen *et al.*, 2017); restringen la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* (Maisuria *et al.*, 2016, Ulrey *et al.*, 2014); presentan propiedades potenciales anti-oxidantes (Yan *et al.*, 2002), anti-adhesión (Eydelnant & Tufenkji, 2008, Feldman *et al.*, 2012), anti-motilidad (Chan *et al.*, 2013, Hidalgo *et al.*, 2011, O'May & Tufenkji, 2011, O'May *et al.*, 2012) y anti-cancerígenas (Neto *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2009).

Por consiguiente, las características antibacterianas y anti-fúngicas del arándano rojo contra los microorganismos orales han llamado mucho a la atención. Varios investigadores han estudiado *in vitro* e *in vivo* cómo ciertos compuestos derivados del arándano rojo podrían interferir en la formación de un *biofilm* cariogénico. A este respecto, está siendo demostrado que ciertos constituyentes del arándano rojo pueden limitar la caries dental, por la inhibición de la producción de ácidos orgánicos, por las bacterias cariogénicas; la formación de *biofilms* por *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*; así como la adhesión y coagregación de un número considerable de otras especies bacterianas orales de *Streptococcus* (Koo *et al.*, 2010, Gregoire *et al.*,

2007, Yamanaka *et al.*, 2004, Weiss *et al.*, 2004, Steinberg *et al.*, 2005, Koo *et al.*, 2006).

Con respecto a las enfermedades periodontales, ha sido descrito que la fracción no dializable constituyente del arándano rojo (NMD) inhibe la formación de *biofilm* por *P. gingivalis* (Labrecque *et al.*, 2006) y *Fusobacterium nucleatum* (Yamanaka *et al.*, 2007), dos especies de bacterias asociadas a la periodontitis crónica. La fracción de NMD también puede inhibir la adhesión de *P. gingivalis* a varias proteínas, incluyendo el colágeno tipo I (Labrecque *et al.*, 2006), y reducir la coagregación de las bacterias periodontales patogénicas (Weiss *et al.*, 2004).

No obstante, la información sobre las propiedades antibacterianas de los extractos naturales del arándano rojo frente a los patógenos periodontales que crecen en *biofilms* multi-especies es escasa (La *et al.*, 2010, Feldman & Grenier, 2012). Puesto que las bacterias patógenas del *biofilm* dental son el factor etiológico primario de las enfermedades periodontales, el presente estudio intenta profundizar en el conocimiento sobre las propiedades *antibiofilm* y antimicrobianas que los polifenoles del arándano rojo tienen frente a algunos de los patógenos periodontales más relevantes. Por ello, el objetivo del presente estudio es evaluar el potencial *antibiofilm* y antimicrobiano de los extractos de arándano rojo frente a seis especies bacterianas (*Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii* y los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*) involucradas en el desarrollo de un modelo validado de *biofilm in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Evaluar la actividad antibacteriana y el potencial inhibitorio en la formación de *biofilms* de los extractos naturales de arándano rojo frente a seis especies bacterianas (*S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii* y los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*), en un modelo validado de *biofilm in vitro*, sobre discos de hidroxiapatita (HA).

2.2. Objetivos específicos

- Investigar las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs, por sus siglas en inglés) y las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs, por sus siglas en inglés) de las 6 especies bacterianas en planctónico;
- Estudiar la actividad antibacteriana frente a las seis bacterias en *biofilm*, en un modelo validado de *biofilm in vitro*;
- Analizar el potencial inhibitorio en la incorporación de las seis especies bacterianas en el modelo de *biofilm in vitro*.

3. HIPÓTESIS

Los polifenoles presentes en el extracto natural de arándano rojo pueden tener un efecto beneficioso en la prevención de la periodontitis, por su actividad antibacteriana y su capacidad inhibitoria de la adhesión de las bacterias implicadas en el desarrollo del *biofilm* subgingival.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Extracto natural de arándano rojo

Los extractos naturales de arándano rojo usados en este estudio fueron cedidos por el grupo de investigación del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL).

Los extractos fueron disueltos en dimetilsulfóxido al 4% (v/v) (DMSO), obteniéndose una concentración *stock* de 20.000 µg/mL

4.2. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Para la realización de este trabajo de investigación se seleccionaron las bacterias que representan los colonizadores iniciales (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y los colonizadores tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*) del *biofilm* subgingival (Tabla 1). Se cultivaron las bacterias en placas con medio Agar Sangre (Oxoid nº2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), suplementado con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L), en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio), a 37°C, de 24 a 72h. De todas ellas se realizaron las curvas de crecimiento, basado en lo descrito por Sanchez *et al.*, (2011) (Figura 3).

Tabla 1 - Cepas seleccionadas y colección de cultivo.

Cepa	Referencia
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ 20482
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ 8324
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC 11810
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC 19039
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT 907T

Legenda: DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; NCTC - National Collection of Type Cultures; ATCC - American Type Cultures Collection; CECT - Colección Española de Cultivos Tipo.

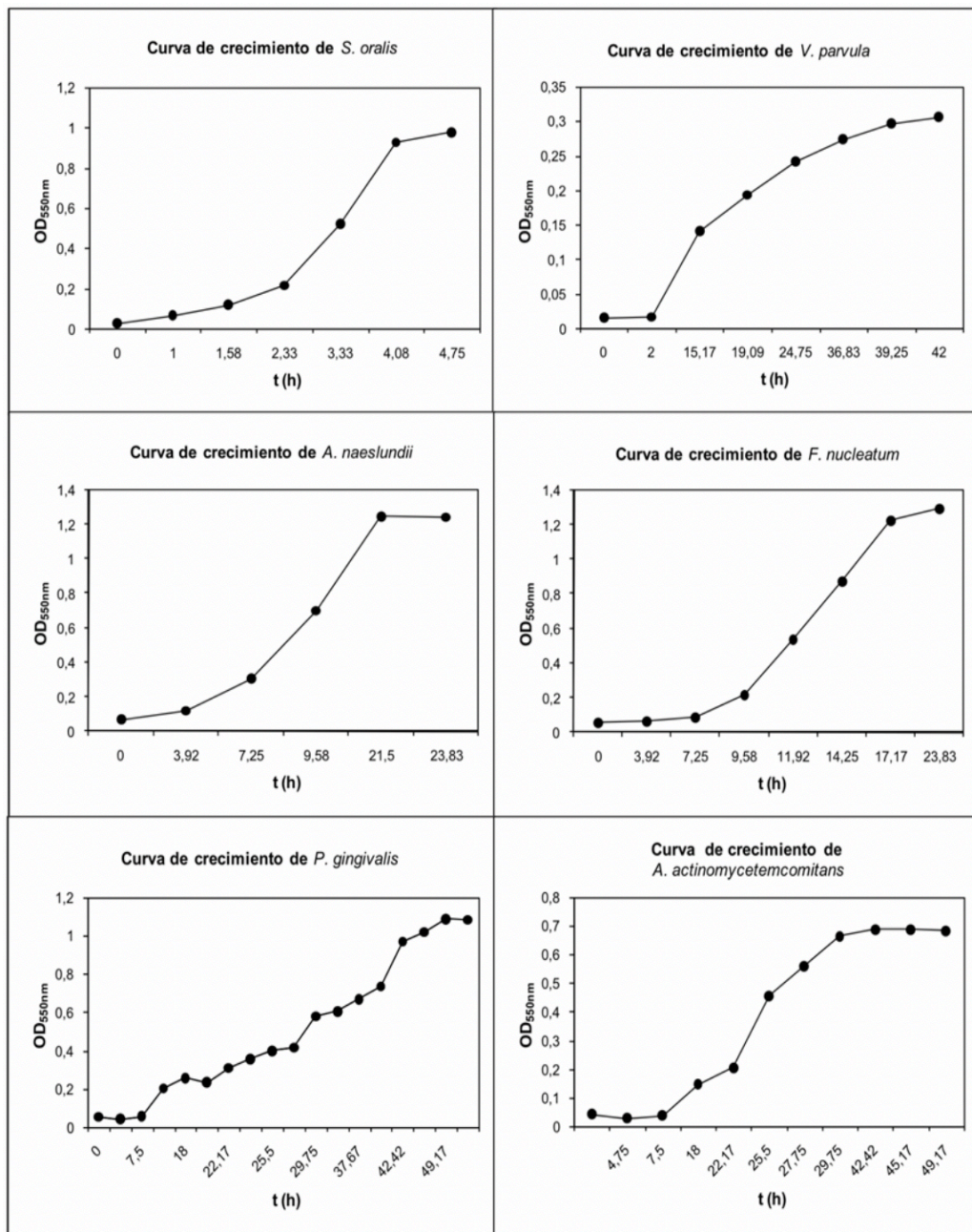


Figura 3 - Curvas de crecimiento de las especies bacterianas utilizadas en el modelo validado de *biofilm in vitro* por Sanchez *et al.*, (2011).

4.3. Experimentos sobre la capacidad antibacteriana de los extractos de arándano rojo

4.3.1. Efecto antibacteriano frente a las bacterias en planctónico

Los cultivos puros de las seis especies bacterianas se cultivaron en anaerobiosis, en un medio rico en proteínas - *Brain-Heart Infusion* (BHI, por sus siglas en inglés) (Becton, Dickinson and Company; Becton, Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) modificado, suplementado con 2,5 g/L de mucina (Oxoid), 1,0 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 0,1 g/L de cisteína (Sigma), 2,0 g/L de bicarbonato de sodio (Merck), 5,0 mg/mL de hemina (Sigma), 1,0 mg/mL de menadiona (Merck) y 0,25% (v/v) de ácido glutámico (Sigma). El crecimiento bacteriano se recogió en la fase media exponencial, interpretado por espectrofotometría (espectrofotómetro de Optic Ivymen System 2100-C; I.C.T.; La Rioja, España) (Figura 4).



Figura 4 - Espectrofotómetro. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Se prepararon inóculos de cada especie bacteriana (*S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*), en que cada inóculo (volumen final de 200 μ L) era constituido por 190 μ L de la especie bacteriana correspondiente (concentración final de 10^6 UFC/mL) y por 10 μ L del extracto natural de arándano rojo a diferentes concentraciones (1.000 μ g/mL; 500 μ g/mL; 250 μ g/mL; 100 μ g/mL y 10 μ g/mL). Los mismos inóculos se sembraron en placas de cultivo de 96 micropocillos, durante 48 horas, a 37°

C, en anaerobiosis. Se utilizaron controles negativos (medios de cultivo sin ningún inóculo/extracto de arándano rojo) y controles positivos (bacterias sin ningún tratamiento), así como un blanco (extracto de arándano rojo o DMSO disuelto en los medios de cultivo) para garantizar la idoneidad del ensayo. Se incluyeron soluciones de DMSO al 4% y de digluconato clorhexidina (CHX) al 0,2% para descartar un efecto bactericida del DMSO, ya que es utilizado para disolver los extractos, y observar el máximo efecto antibacteriano, respectivamente.

La absorbancia [densidad óptica (D.O.) de 595 nm] fue medida mediante un lector de placas de microtitulación (espectrofotómetro). Se midió la absorbancia a intervalos seleccionados, con el fin de determinar el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo hasta que las bacterias alcanzaran la fase de crecimiento estacionario.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de cada especie bacteriana se calculó por cultivo en placa de agar sangre. Por consiguiente, la concentración más baja de los extractos de arándano rojo que mostraron inhibición al menos del 25% del crecimiento bacteriano se consideró como la MIC, mientras que la concentración más baja de los mismos extractos que alcanzó un crecimiento bacteriano nulo se consideró como la MBC.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado con los controles apropiados.

4.3.2. Efecto en la viabilidad bacteriana en un modelo de *biofilm* oral *in vitro*

Cultivos puros de cada especie bacteriana se incubaron en anaerobiosis, a 37°C, en 15 mL de medio BHI modificado. El crecimiento bacteriano se recogió en la fase exponencial (medido por espectrofotometría), preparando a continuación una suspensión mixta de las seis especies en medio BHI modificado, cuya constitución es presentada en la Tabla 2.

Tabla 2 - Cepas seleccionadas y su concentración final en el preinóculo.

Cepa	Concentración final (UFC/mL)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 ⁶
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10 ⁶
<i>Veillonela parvula</i>	10 ⁵
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10 ⁵
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10 ⁶
<i>Streptococcus oralis</i>	10 ³
Leyenda: UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro.	

A continuación, se procedió a la formación del *biofilm* sobre los discos estériles de HA de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de grosor (desviación estándar (DS) de 0.2 mm; Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, EE.UU.). Estos discos de HA fueron recubiertos con saliva estéril tratada durante 4 horas, a 37°C, en tubos de plástico estériles, antes del experimento en la placa de cultivo de 24 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania). Cada pocillo fue inoculado con 1,5 mL de suspensión mixta de bacterias preparadas e incubadas en condiciones anaeróbicas (10% de H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio), a 37°C, durante 72 h. Las placas empleadas para evaluar la esterilidad del medio de cultivo se usaron como controles. Además, se utilizó como control del proceso el medio de cultivo BHI modificado sin inocular, de forma a confirmar la esterilidad del medio y la correcta manipulación e incubación. Transcurrido ese tiempo, se retiraron los discos del medio de cultivo con el *biofilm* ya formado, en condiciones de esterilidad, para su posterior tratamiento con extractos naturales de arándano rojo a diferentes concentraciones (Figura 5).

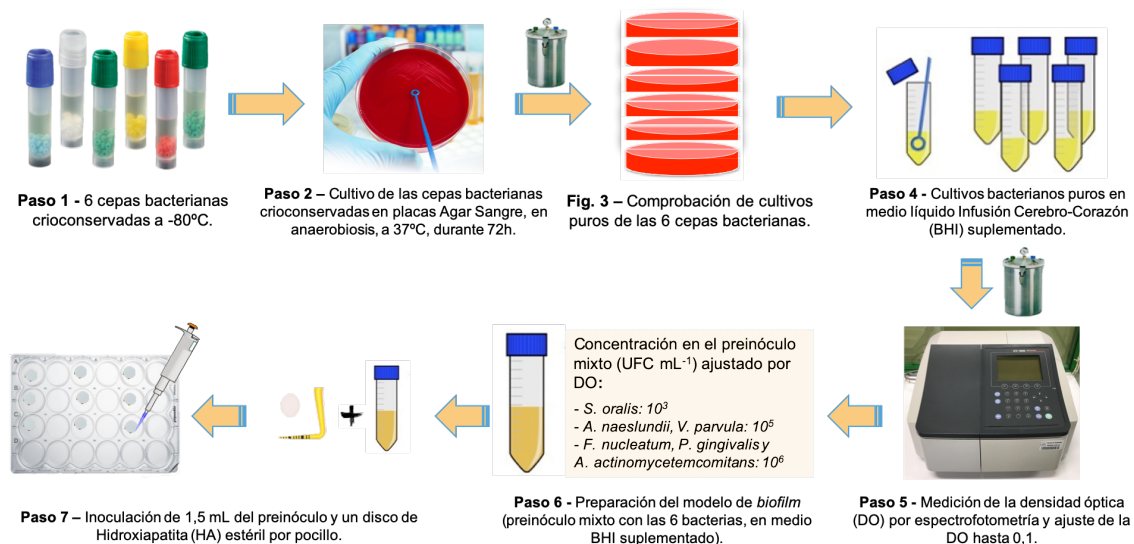


Figura 5 - Representación esquemática de la preparación del modelo de *biofilm* subgingival multi-especies *in vitro*, según Sanchez *et al.*, (2011).

De forma a optimizar la metodología de evaluación del efecto antibacteriano del extracto de arándano rojo frente a las seis especies bacterianas en *biofilm*, y en base a las MBCs obtenidas, se probó un rango de concentraciones (desde la MBC hasta la solución de *stock* del extracto de arándano rojo - 20.000 µg/mL) (datos no mostrados). Se concluyó que la dosis de 20.000 µg/mL produjo las tasas antibacterianas más altas y por tanto se utilizó para el estudio del efecto antibacteriano en *biofilm*.

Tras 72 horas de incubación, los *biofilms* fueron sumergidos durante 30 y 60 segundos en el extracto de arándano rojo (20.000 µg/mL) a temperatura ambiente. Se seleccionaron los referidos tiempos de exposición debido a que el extracto de arándano rojo es un producto bioactivo, comercialmente disponible, y, como tal, se eligieron los mismos tiempos de exposición estándar establecidos para otros productos antimicrobianos comercialmente disponibles (por ejemplo, los productos con CHX) (Mah & O'toole, 2001, Donlan & Costerton, 2002, Davies, 2003). Se usó PBS, como control negativo, y DMSO al 4% para descartar el efecto bactericida del solvente.

La capacidad antibacteriana sobre los *biofilms* de 72 horas se llevó a cabo a partir de la determinación de la reducción del número de UFC/mL viables, mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) y por microscopía de barrido láser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés).

Cada experimento se realizó por triplicado (con tríos de *biofilms* por replica).

4.4. Efecto sobre la adhesión bacteriana *in vitro*

Para optimizar la metodología de evaluación del efecto anti-adhesión del extracto de arándano rojo frente a las seis especies bacterias mencionadas, se evaluaron diferentes concentraciones, basadas en las MICs de cada especie bacteriana en estado planctónico. Se concluyó que la dosis de 200 µg/mL generó las tasas anti-adhesión más altas sin afectar la viabilidad bacteriana en estado planctónico (datos no mostrados).

La Figura 6 muestra un esquema de la metodología seguida para evaluar la capacidad anti-adhesión bacteriana de los extractos de arándano rojo. Para ello se preparó una suspensión mixta las seis especies bacterias en el medio BHI modificado, como se describió anteriormente y cuya constitución está descrita en la Tabla 2. Después, los discos de HA se sumergieron con saliva estéril tratada en tubos de plástico estériles, durante 4 horas, a 37°C. A continuación, se colocaron los mismos en los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos. Cada pocillo se inoculó con 1.5 mL de la suspensión mixta de bacterias preparada y una solución de extracto de arándano rojo (200 µg/mL), o con PBS (control negativo) o DMSO al 4% (para descartar su posible efecto en la adhesión). Las placas se incubaron en condiciones anaeróbicas, a 37°C, durante 6 h.

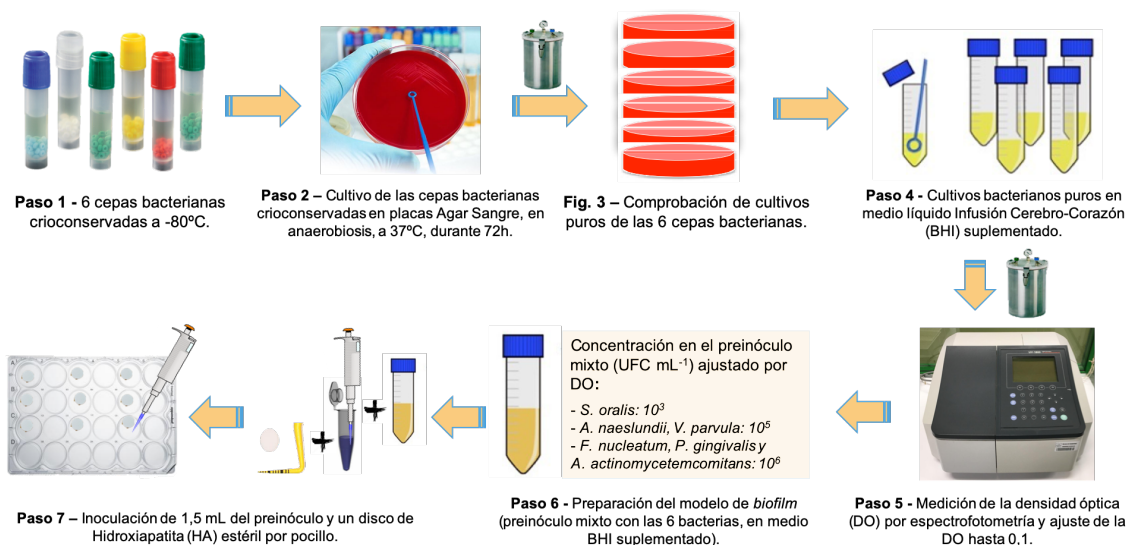


Figura 6 - Representación esquemática de la preparación del modelo de *biofilm* subgingival multi-especies *in vitro*, según Sanchez *et al.*, (2011), para evaluar la capacidad anti-adhesión bacteriana de los extractos de arándano rojo.

La capacidad *antibiofilm* se llevó a cabo a partir de la determinación de la reducción del número de UFC/mL presentes en el *biofilm* sobre los discos de HA a las 6 horas de incubación, mediante qPCR, y por CLSM.

Cada experimento se realizó por triplicado (con tríos de *biofilms* por replica).

4.5. Tratamiento de las muestras microbiológicas

Después de los experimentos mencionados, los *biofilms* fueron lavados en 2 mL de PBS estéril (inmersión de 10 segundos por lavado), en tres ocasiones, para remover cualquier remanente de los extractos de arándano rojo y bacterias no adheridas. A continuación, los *biofilms* fueron desprendidos de los discos de HA mediante un procedimiento de agitación vigorosa (utilizando vortex) durante 2 min en 1 mL de PBS.

En el experimento de la actividad antibacteriana se utilizó propidio de monoazida (PMA) (Biotium Inc., Hayward, CA, EE.UU.) para discriminar el ADN de las bacterias vivas y de las muertas. Este fluorocromo tiene la capacidad de discriminar las bacterias viables y las bacterias irreversiblemente dañadas y, así, combinado con la qPCR, detectar el ADN solo procedente de las bacterias viables (Sanchez *et al.*, 2014). Se añadió el PMA a los tubos de la muestra que contenían 250 μ L de células del *biofilm* disgregado, con una concentración final de 100 μ M. A continuación, tras un periodo de incubación de 10 minutos, a 4°C, en la oscuridad, las muestras fueron sometidas a 30 minutos de exposición lumínica usando el dispositivo *PMA-Lite LED Photolysis* (Biotium Inc.). Después de la fotoactivación, las bacterias fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 3 minutos, antes de procederse al aislamiento del ADN. Para controlar cualquier posible influencia del proceso experimental sobre la viabilidad bacteriana, se realizó el mismo procedimiento (incubación a 4°C y exposición a una fuente de luz), pero sin la exposición a PMA (control negativo).

El ADN bacteriano fue después aislado de todos los *biofilms* con el kit comercial *ATP Genomic DNA Mini Kit*[®] (ATP biotech. Taipei, Taiwán), según las instrucciones del fabricante y se utilizó la técnica de qPCR mediante el ensayo de sondas de hidrólisis 5'nucleasa para detectar y cuantificar el ADN bacteriano. La amplificación de la qPCR fue realizada según el protocolo

previamente optimizado por el grupo de investigación ETEP (Etiología y Terapéutica de las Enfermedades Periodontales), utilizándose cebadores y sondas [sintetizados por *Life Technologies Invitrogen* (Carlsbad, CA, EE.UU.)] dirigidas al gene 16S rRNA (Sánchez *et al.*, 2014) (Tabla 3).

Tabla 3 - Secuencias de los cebadores y sondas utilizados para la detección y cuantificación del ADN genómico de las bacterias involucradas en el desarrollo del *biofilm*. En todos los casos, los cebadores y las sondas se han dirigido al gen 16S rRNA (Sánchez *et al.*, 2014).

Bacteria	Secuencia (5' – 3')	Longitud (pb)
So Avance Reverso Sonda	CAACGATACATAGCCGACCTGAG TCCATTGCCGAAGATTCC 6FAM-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA -BBQ	97
Vp Avance Reverso Sonda	TGCTAATACCGCATACGATCTAACC GCTTATAAATAGAGGCCACCTTTCA 6FAM-CTATCCTCGATGCCGA -TAMRA	66
An Avance Reverso Sonda	GGCTGCGATACCGTGAGG TCTGCGATTACTAGCGACTCC 6FAM- CCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT-BBQ	103
Pg Avance Reverso Sonda	GCGCTCAACGTTTCAGCC CACGAATTCCGCCTGC 6FAM-CACTGAAGTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA	67
Aa Avance Reverso Sonda	GAACCTTAC CTA CTACTCTTGACATCCGAA TGCAGCACCTGTCTCAAAGC 6FAM-AGAAGTCAAGAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA	80
Fn Avance Reverso Sonda	GGATTTATTGGGCGTAAAGC GGCATTCTACAAATATCTACGAA 6FAM-CTCTACACTTGTAGTTCGG-TAMRA	162
Legenda: So - <i>S. oralis</i> ; Vp - <i>V. parvula</i> ; An - <i>A. naeslundii</i> ; Aa – <i>A. actinomycetemcomitans</i> ; Fn - <i>F. nucleatum</i> ; Pg - <i>P. gingivalis</i> ; pb – pares de bases.		

La reacción se realizó en un volumen final de 20 µL con el siguiente contenido - 10 µL de 2x *master mixture* (LC 480 Probes Master; Roche), la concentración óptima de cebadores y sondas (900, 900 y 300 nM para *S. oralis*; 750, 750 y 400 nM para *V. parvula*; 300, 300 y 300 nM para *A. naeslundii*; 300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 y 300 nM para *P. gingivalis*; 600, 600 y 300 nM para *F. nucleatum*), y 2 µL de ADN de las muestras del *biofilm*. Las muestras fueron sometidas a un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 10 min, seguidos de 45 ciclos a 95°C

durante 15 segundos y 60°C durante 1 min. Se utilizó el equipo *LightCycler*[®] 480 II *thermocycler* (Roche). Las placas usadas en el estudio fueron *FramStar* 480 (4titude, The North Barn Damphurst Lane, Inglaterra) selladas con *qPCR Adhesive Clear Seals* (4titude).

Cada muestra de ADN fue analizada por duplicado. Los valores del ciclo de cuantificación (Cq), anteriormente conocidos como valores umbral del ciclo (Ct), describen los números de ciclos de la PCR en el cual la fluorescencia sobrepasa al estado basal. Ese valor fue determinado usando el *software* informático (LC 480 Software 1,5; Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania). La cuantificación del número de células vivas detectadas por qPCR se basó en curvas estándar. Para ello, 1 mL de cada una de las seis especies utilizadas en el estudio, a una concentración de 10⁹ UFC/mL, fueron sometidas al método de extracción de ADN anteriormente mencionado. Se realizaron diluciones seriadas de cada ADN de las distintas bacterias en agua estéril, con un rango de 10⁹-10⁰ UFC/mL. Las curvas estándar fueron construidas con los valores Cq generados en la qPCR frente al logaritmo (log) de UFC/mL. La correlación entre los valores de Cq y las UFC/mL fue generada automáticamente a través del *software* informático (LC 480 Software 1,5; Roche).

Todos los ensayos fueron desarrollados con un rango de detección lineal cuantitativa establecido por el rango de la pendiente de 3,3-3,7 ciclos/log, $r^2 > 0,997$ y un rango de eficiencia de 1,9-2,0.

4.6. Análisis de los *biofilms* por CLSM

Tras el tratamiento antimicrobiano y de anti-adhesión referidos anteriormente y *a priori* del análisis de CLSM, los discos de HA con los *biofilms* fueron inmediatamente lavados en 2 mL de PBS estéril (inmersión de 10 segundos por lavado) tres veces, para remover posibles restos de los extractos y de bacterias no adheridas.

La imagen de microscopía confocal no invasiva de los *biofilms* totalmente hidratados se llevó a cabo usando el microscopio Ix83 *Olympus* de fase fija

acoplado a un sistema confocal *Olympus FV1200* (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japón). Las muestras fueron teñidas con el *kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit solution* (Molecular Probes B. V., Leiden, Holanda) a temperatura ambiente. Se utilizó la razón 1:1 de fluorocromo con un tiempo de tinción de 9 ± 1 minutos para obtener la señal óptima de fluorescencia a las longitudes de onda correspondientes (Syto9: 515-530 nm, ioduro de propidio (IP): >600 nm). Se seleccionaron al menos tres localizaciones separadas y representativas, en los discos de HA cubiertos con *biofilm*, para realizar las mediciones (basado en la presencia de colonias o torres de agregaciones bacterianas identificadas en el campo de visión confocal). El *software* CLSM fue ajustado para tomar una serie z de exploraciones (xyz) de 1 μ m de espesor (8 bits, 1024x1024 píxeles). El *software Olympus®* (Olympus) fue usado para analizar las imágenes de las colonias o torres de agregaciones bacterianas.

El análisis de las imágenes y la razón de células vivas/células muertas (es decir, el área ocupado por las células vivas dividida por el área ocupado por las células muertas) se realizó con el *software Fiji* (ImageJ versión 2.0.0-rc-65/1.52b, el cual es un software de procesamiento de imágenes de fuente abierta).

4.7. Análisis estadístico

Las variables dependientes seleccionadas para estudiar el efecto antibacteriano de los extractos de arándano rojo fueron:

- Los recuentos de las bacterias viables presentes en los *biofilms*, expresados como UFC/mL viables de *S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, obtenidos por qPCR;
- La proporción de células vivas/células muertas de todo el *biofilm*, obtenida por CLSM.

Se realizó un análisis a nivel del experimento para cada parámetro del estudio (n=9 para qPCR y n=3 para los resultados de CLSM). Para evaluar la normalidad de la distribución de los datos se usó el test de *Shapiro-Wilk*. El

efecto de cada solución (extracto de arándano rojo, PBS y DMSO al 4%) y el tiempo de exposición (30 y 60 segundos) (variables independientes) y su interacción con las variables dependientes (recuentos expresados como UFC/mL y razón células vivas/células muertas), se evaluó mediante el test paramétrico ANOVA, para más de dos muestras independientes (variables cuantitativas). Se construyó un modelo lineal general para cada especie bacteriana para los resultados de qPCR y para la razón células vivas/células muertas de las bacterias totales del biofilm completo obtenido por CLSM, utilizándose el método de máxima verosimilitud y las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Para estudiar el efecto anti-adhesión de los extractos de arándano rojo, las variables dependientes seleccionadas fueron:

- Los recuentos de las bacterias viables presentes en los *biofilms*, expresados como UFC/mL viables de *S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, obtenidos por qPCR;
- La proporción de células vivas/células muertas de todo el *biofilm*, obtenida por CLSM.

Se realizó un análisis a nivel del experimento para cada parámetro del estudio (n=9 para qPCR y n=3 para los resultados de CLSM). Para evaluar la normalidad de la distribución de los datos se usó el test de *Shapiro-Wilk*. El efecto de cada solución (extracto de arándano rojo, PBS y DMSO al 4%) en las variables dependientes (recuentos expresados como UFC/mL y razón células vivas/células muertas), se evaluó mediante el test paramétrico ANOVA, para más de dos muestras independientes (variables cuantitativas).

Los datos se expresaron como medias \pm DS y como el porcentaje medio de inhibición, el cual se calculó mediante la ecuación: Porcentaje de inhibición = [(UFC/mL del *biofilm* de control negativo - UFC/mL del *biofilm* tratado) / UFC/mL de control negativo] x 100%. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0,05$. El análisis de los datos se hizo

en el *software* informático (IBM SPSS Statistics 24,0; IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.).

5. RESULTADOS

5.1. Estudio de la capacidad antibacteriana de los extractos de arándano rojo

5.1.1. MIC y MBC de las especies bacterianas en planctónico

Para evaluar la efectividad antibacteriana de los extractos naturales de arándano rojo frente a las especies bacterianas en planctónico, involucradas en el desarrollo de un modelo validado de *biofilm in vitro*, fueron determinadas las MICs y MBCs de cada una de las especies bacterianas nombradas anteriormente, mediante el ensayo de microtitulación.

Con respecto a las **MICs**, las concentraciones bacteriostáticas medias de los extractos de arándano rojo fueron las siguientes: 100 µg/mL frente a *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, 250 µg/mL para *A. naeslundii* y *A. actinomycetemcomitans*, 500 µg/mL para *V. parvula* y superior a 1.000 µg/mL contra *S. oralis*.

En relación a las **MBCs**, se observa la misma tendencia, es decir, las medias de las concentraciones mínimas bactericidas fueron las siguientes: 250 µg/mL contra *P. gingivalis*, de 1.000 µg/mL contra *F. nucleatum* y superior a 1.000 µg/mL contra *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, y *A. actinomycetemcomitans*.

De acuerdo con estos resultados, se observa que los extractos naturales de arándano rojo presentan actividad antimicrobiana, exhibiendo las propiedades antimicrobianas más relevantes frente a los patógenos periodontales *P. gingivalis* y *F. nucleatum*.

5.1.2. Efecto antibacteriano en el modelo de *biofilm in vitro*

El efecto del extracto de arándano rojo (concentración de 20.000 µg/mL), comparado con las soluciones de control negativas PBS y DMSO al 4% (debido a la posible actividad antimicrobiana), en el recuento medio de bacterias viables incluidas en los *biofilms* de 72 h, se representan en la Tabla 4 y en la Figura 7.

Tras la exposición de 30 y 60 segundos de las seis especies bacterianas organizadas en *biofilm*, a los extractos de arándano rojo, se observaron reducciones significativas en los recuentos de bacterias viables de los colonizadores iniciales. Se observó una reducción significativa en los recuentos de bacterias viables de *S. oralis* después de 30 segundos de exposición ($p < 0,001$) y de 60 segundos ($p = 0,017$) en comparación con el control negativo (PBS), alcanzándose en ambos los casos reducciones del 98,9% en las UFC/mL (Tabla 4; Figura 7). Sin embargo, también se observaron reducciones significativas en la viabilidad bacteriana de *S. oralis* causadas por el DMSO al 4% (Tabla 4). Los extractos de arándano rojo afectaron significativamente, dentro del biofilm a *A. naeslundii* (reducción del 65,7%) y *V. parvula* (reducción del 66,7%), tras 30 segundos de exposición ($p = 0,006$ y $p = 0,010$, respectivamente), sin haber reducciones significativas en los recuentos de bacterias viables de las dos especies bacterianas mencionadas al DMSO al 4% ($p > 0,05$) después de 30 y 60 segundos de exposición (Tabla 4). No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los tiempos de exposición (30 segundos *versus* 60 segundos) a los extractos de arándano rojo para *S. oralis*, *A. naeslundii* y *V. parvula* ($p > 0,05$ para todos los casos).

Por lo que respecta al colonizador secundario *F. nucleatum*, se observó un efecto relevante sobre las UFC/mL viables en el *biofilm* tras la exposición de 30 segundos a los extractos de arándano rojo ($p = 0,164$). Después de 60 segundos de contacto con los mismos extractos, en comparación con el control negativo (exposición a PBS), se alcanzó una disminución del 75,3% en las UFC/mL viables ($p = 0,448$) (Tabla 4; Figura 7). De la misma forma, no se observaron reducciones estadísticamente significativas en las UFC/mL viables después de 30 y 60 segundos de exposición a DMSO al 4% ($p > 0,05$), en comparación con el control negativo (exposición a PBS). En cambio, para *F. nucleatum*, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las UFC/mL viables cuando se compararon los dos tiempos de exposición a los extractos de arándano rojo ($p = 0,022$).

En cuanto a los patógenos periodontales, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, no se observaron reducciones estadísticamente significativas en las UFC/mL viables después de 30 y 60 segundos de exposición a los

extractos de arándano rojo o al DMSO al 4% ($p > 0,05$), en comparación con el control negativo (exposición a PBS). Se obtuvo una reducción del 11,5% de las UFC/mL viables para *A. actinomycescomitans* y del 39,3% para *P. gingivalis*, tras 60 segundos de exposición a extractos de arándano rojo (Tabla 4; Figura 7). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los tiempos de exposición (30 segundos *versus* 60 segundos) a los extractos de arándano rojo ($p = 0,313$ y $p = 0,208$, respectivamente).

Tabla 4 - Efecto antimicrobiano del extracto de arándano rojo en el número medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) y su desviación estándar (DS) de cada especie bacteriana en los *biofilms in vitro*, obtenidas por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Bacterias	Tiempo de Exposición	UFC/mL viables (media \pm DS)		
		Biofilm Control (PBS)	Tratamiento con el agente antimicrobiano correspondiente	
			Extracto de arándano rojo	DMSO al 4%
<i>S. oralis</i>	30 seg	$1,2 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$ *	$8,3 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^5$ *
	60 seg	$6,8 \times 10^5 \pm 4,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^3 \pm 4,4 \times 10^3$ *	$2,8 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^5$
<i>A. naeslundii</i>	30 seg	$6,7 \times 10^4 \pm 5,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$ *	$3,4 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$
	60 seg	$2,2 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4 \pm 2,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$
<i>V. parvula</i>	30 seg	$3,6 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$ *	$2,0 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^6$
	60 seg	$1,6 \times 10^6 \pm 8,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$
<i>A. actinomycescomitans</i>	30 seg	$7,2 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6 \pm 4,7 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6 \pm 3,0 \times 10^6$
	60 seg	$5,2 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6 \pm 4,4 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6 \pm 4,9 \times 10^6$
<i>P. gingivalis</i>	30 seg	$1,7 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6 \pm 5,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^6$
	60 seg	$8,9 \times 10^5 \pm 6,8 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^5$
<i>F. nucleatum</i>	30 seg	$3,8 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$
	60 seg	$1,5 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$	$3,7 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$

Leyenda: CFU/mL – unidades formadoras de colonias por mililitro de células vivas; DS – desviación estándar; seg – segundos; PBS – solución salina tamponada con fosfato; DMSO – dimetilsulfóxido.

* $p < 0,05$ cuando comparado con el control negativo (exposición a PBS).

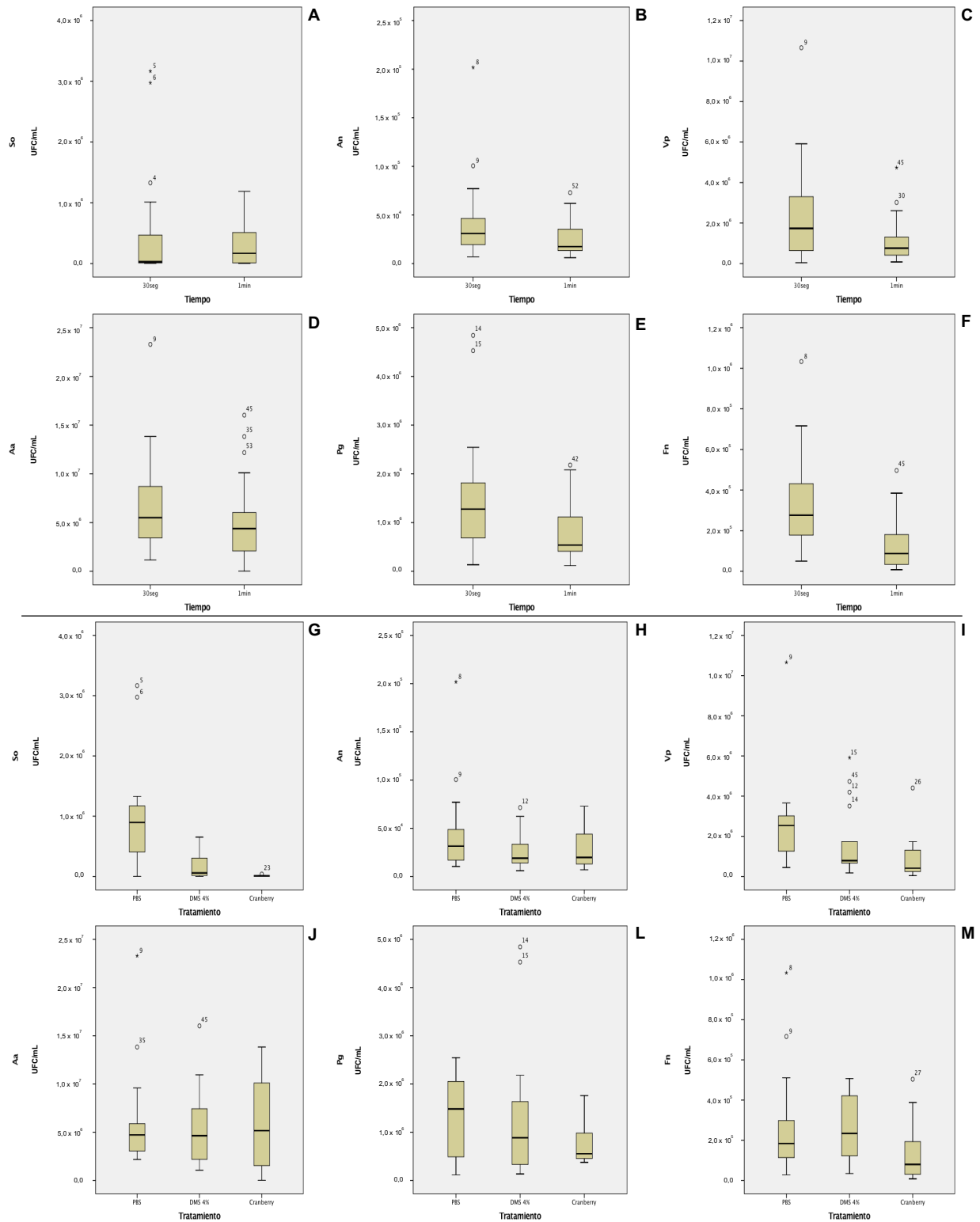


Figura 7 – Representación de los *box plot* del efecto en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) viables de las seis especies bacterianas (*So* – *Streptococcus oralis*; *An* – *Actinomyces naeslundii*; *Vp* – *Veillonela parvula*; *Aa* – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg* - *Porphyromonas gingivalis*; *Fn* – *Fusobacterium nucleatum*, organizadas en *biofilm*, del: (A – F) tratamiento con el extracto de arándano rojo (20.000 $\mu\text{g/mL}$), tras 30 y 60 segundos de exposición; (G – M) tratamiento del extracto de arándano rojo (20.000 $\mu\text{g/mL}$) respecto a los controles negativos solución salina tamponada con fosfato (PBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%, tras 60 segundos de exposición.

El análisis de CLSM mostró que, después de 72 h de incubación, los *biofilms* control cubrían toda la superficie de los discos de HA, como una capa plana de células combinadas con colonias o torres de agregaciones bacterianas (razón células vivas/células muertas de $1,38 \pm 0,06$) (Figura 8 A, B). Se pudo observar que, después de 30 segundos de exposición a los extractos de arándano rojo y a la solución de DMSO al 4%, la vitalidad celular en los *biofilms* disminuyó (razón células vivas/células muertas de $0,68 \pm 0,11$ para los extractos de arándano rojo y $0,79 \pm 0,03$ para el DMSO al 4%; $p > 0,05$ en ambos casos, en comparación con los *biofilms* control) (Figura 8 C, E). Después de 60 segundos de exposición a los extractos de arándano rojo (Figura 8 F), la reducción en la viabilidad celular pareció ser más pronunciada cuando se aplicaron los extractos de arándano rojo y la solución de DMSO al 4% (razón células vivas/células muertas de $0,55 \pm 0,01$ para los extractos de arándano rojo y $0,78 \pm 0,08$ para el DMSO al 4%; $p > 0,05$ en ambos casos, en comparación con los *biofilms* control) en relación a los *biofilms* control (razón células vivas/células muertas de $1,17 \pm 0,09$) (Figura 8 D).

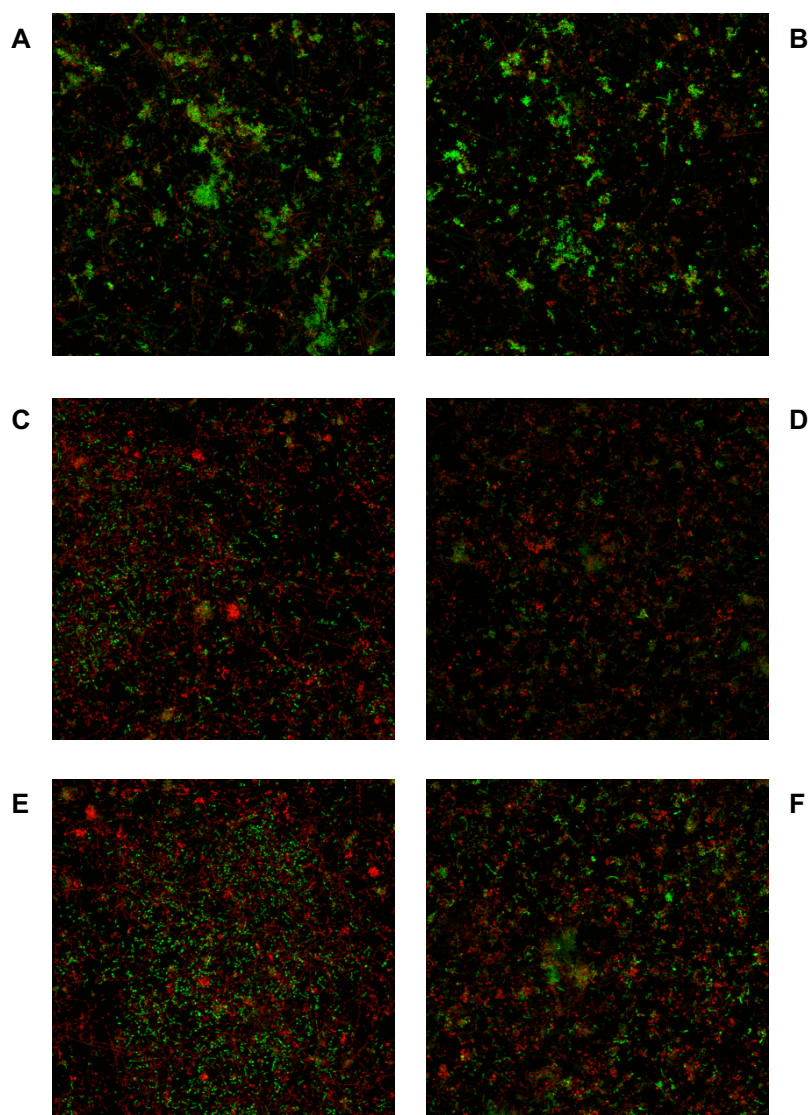


Figura 8 - Proyección máxima de imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los *biofilms* de 72 h, donde se observa el crecimiento de esos *biofilms* sobre las superficies de los discos de HA, teñidas con *LIVE/DEAD[®] BacLightTM Bacterial Viability Kit*, tras 30 y 60 segundos de exposición: (A, B) al control negativo (solución salina tamponada con fosfato, PBS), respectivamente; (C, D) a la solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%, respectivamente; (E, F) a los extractos de arándano rojo (concentración de 20.000 µg/mL), respectivamente.

5.2. Efecto inhibitorio de los extractos de arándano rojo en la formación de *biofilm in vitro*

Los datos presentados en la Tabla 5 indican que los extractos naturales de arándano rojo, a una concentración de 200 µg/mL inhibieron significativamente la incorporación de las seis especies bacterianas en el modelo de *biofilm in vitro*.

Tras 6 horas de exposición a los extractos de arándano rojo, hubo una disminución significativa de los colonizadores primarios en la superficie de los discos de HA, alcanzándose reducciones aproximadamente del 98,9% para *S. oralis* ($p < 0,001$) y de 88,7% para *V. parvula* ($p < 0,001$), en comparación con los *biofilms* control (Tabla 5; Figura 9).

Los colonizadores secundarios y tardíos mostraron la misma tendencia. *P. gingivalis* fue la especie bacteriana cuya adhesión se vio más afectada por la acción del extracto, alcanzando las $1,1 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^3$ UFC/mL, en comparación con las $4,0 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^4$ UFC/mL, en los *biofilms* control ($p < 0,001$), lo que resulta en una reducción de su incorporación del 97,3%. *A. actinomycescomitans* y *F. nucleatum* también sufrieron una reducción significativa en su incorporación en el *biofilm* ($p < 0,001$, en ambos casos), reduciéndose en 84,0% y 75,7%, respectivamente. No obstante, en todos los casos con excepción de *V. parvula* fueron observadas diferencias significativas en la viabilidad causada por la solución de DMSO al 4%, en comparación con los *biofilms* control ($p < 0,005$ en todos los casos) (Tabla 5; Figura 9).

Tabla 5 - Efecto inhibitorio en la formación de *biofilm*, de los extractos de arándano rojo, reflejado en el número medio de bacterias (expresado en UFC/mL), incorporadas en el *biofilm in vitro* de 6 horas, formado sobre las superficies de los discos de HA. Estos datos fueron obtenidos por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Bacterias	UFC/mL viables (media \pm DS)		
	Biofilm Control (PBS)	Tratamiento con el agente antimicrobiano correspondiente	
		Extracto de arándano rojo	DMSO al 4%
<i>S. oralis</i>	$1,2 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3 \pm 5,3 \times 10^2$ *	$5,5 \times 10^2 \pm 2,6 \times 10^2$ *
<i>A. naeslundii</i>	$4,8 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4 \pm 7,6 \times 10^4$	$6,4 \times 10^4 \pm 1,9 \times 10^4$
<i>V. parvula</i>	$2,3 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^3$ *	$2,0 \times 10^4 \pm 7,3 \times 10^3$
<i>A. actinomycescomitans</i>	$7,5 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5 \pm 9,5 \times 10^4$ *	$3,8 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$ *
<i>P. gingivalis</i>	$4,0 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^3$ *	$1,0 \times 10^4 \pm 9,9 \times 10^3$ *
<i>F. nucleatum</i>	$1,1 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^4$ *	$5,9 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^4$ *

Leyenda: CFU/mL – unidades formadoras de colonias por mililitro de células vivas; DS – desviación estándar; PBS – solución salina tamponada con fosfato; DMSO – dimetilsulfóxido.

* $p < 0,05$ cuando comparado con el control negativo (exposición a PBS).

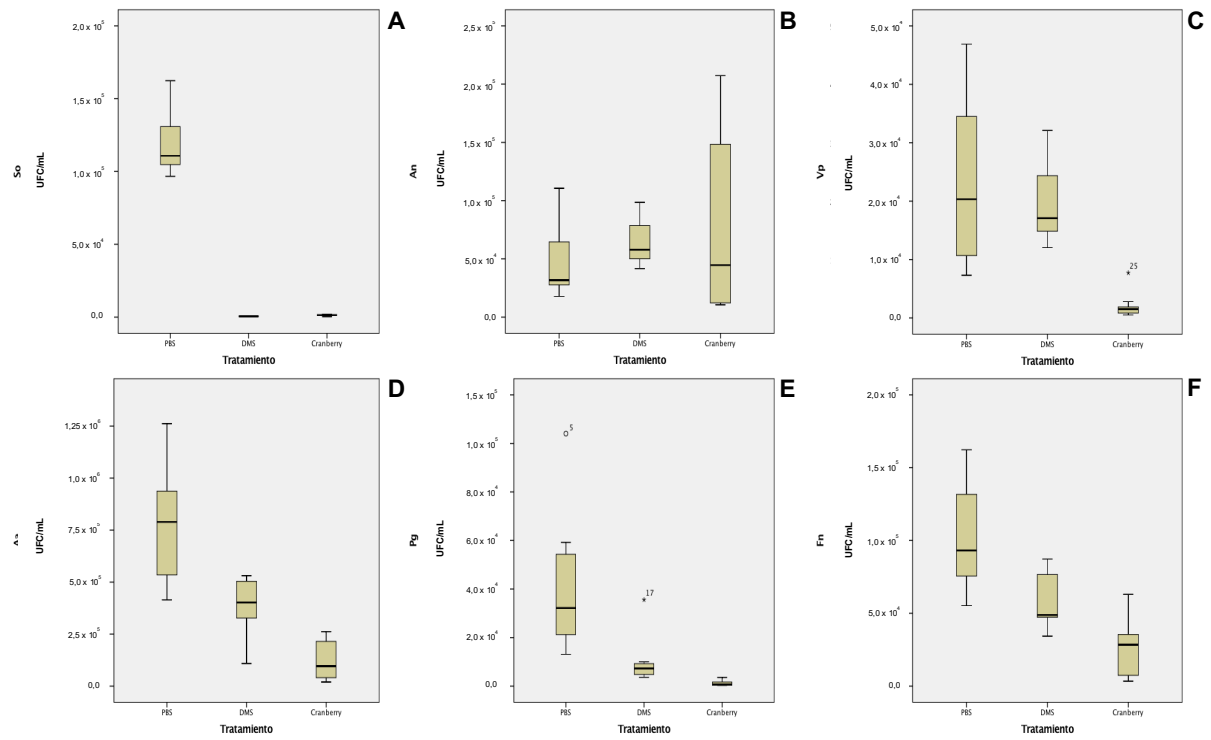


Figura 9 - Representación de los *box plot* del efecto en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de las seis especies bacterianas (*So* – *Streptococcus oralis*; *An* – *Actinomyces naeslundii*; *Vp* – *Veillonella parvula*; *Aa* – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg* - *Porphyromonas gingivalis*; *Fn* – *Fusobacterium nucleatum*), organizadas en *biofilm*, del tratamiento con el extracto de arándano rojo (200 µg/mL), respecto a los controles negativos solución salina tamponada con fosfato (PBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%, tras 6 horas de exposición.

El análisis de CLSM mostró que, después de 6 h de incubación, los *biofilms* formados en los discos de HA cubrieron la superficie de los mismos, según el patrón de colonización de estas comunidades bacterianas con un alto porcentaje de células vivas *versus* células muertas y una razón células vivas/células muertas de $1,74 \pm 0,01$ (Figura 10 A, B). Sin embargo, el efecto de 6 horas de exposición de las bacterias a la solución de arándano rojo (200 µg/mL) se percibió significativamente, ya que no se pudo ver un *biofilm* estructurado en la superficie de los discos de HA, como en las muestras de *biofilm* control. Se observó una reducción significativa en la biomasa de los *biofilms* tratados, observándose también de forma significativa menos colonias bacterianas en los mismos *biofilms* tratados con arándano rojo, en comparación con los *biofilms* control (Figura 10 C, D). Para descartar el efecto *antibiofilm* del DMSO al 4%, utilizado para disolver los extractos de arándano rojo, también se estudió el efecto del mismo solvente, el cual produjo una razón células

vivas/células muertas de $1,04 \pm 0,01$ (Figura 10 E, F). Se pudo apreciar que, aunque el porcentaje de bacterias muertas, tras 6 horas de exposición a la solución de DMSO al 4%, fue algo mayor que en los *biofilms* control expuestos a PBS, las bacterias pudieron colonizar la superficie de los discos de HA y organizarse en *biofilm*, sin representar diferencias estadísticamente significativas cuando comparadas con los *biofilms* control.

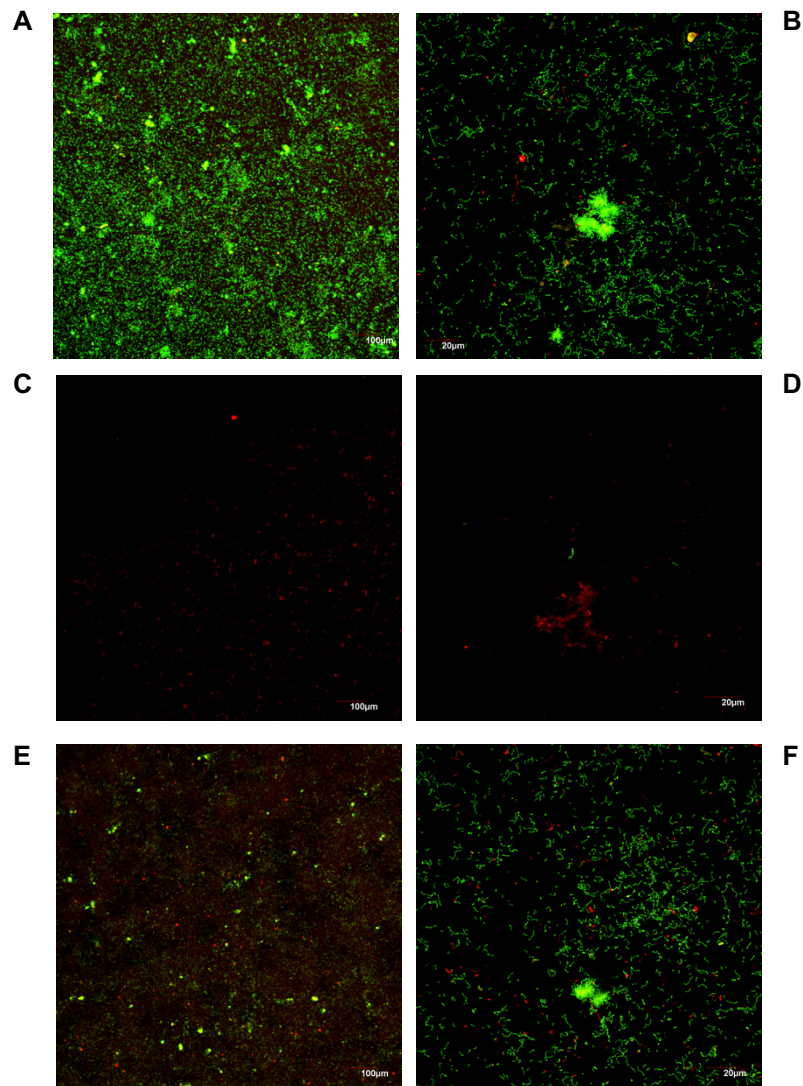


Figura 10 - Proyección máxima de imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los *biofilms* de 6 horas, expuestos a una solución de arándano rojo (200 µg/mL), donde se observa el crecimiento de esos *biofilms* sobre las superficies de los discos de HA, teñidos con el Kit *LIVE/DEAD*[®] *BacLight*TM *Bacterial Viability*, tras la exposición: (A,B) al control negativo (solución salina tamponada con fosfato, PBS); (C,D) a la solución de arándano rojo; (E,F) a la solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%.

6. DISCUSIÓN

Este estudio ha demostrado que el extracto de arándano rojo tiene un efecto antibacteriano frente a las seis especies bacterianas seleccionadas en estado planctónico. Sin embargo, cuando estas especies bacterianas se organizan en *biofilm*, la actividad antibacteriana se ve limitada. La viabilidad bacteriana dentro de un *biofilm* se vio afectada más intensamente por los extractos de arándano rojo en los colonizadores primarios *S. oralis* y *V. parvula* que en el resto de las bacterias, sin efecto estadísticamente significativo frente a los patógenos periodontales. En cambio, la incorporación de las seis especies bacterianas se vio afectada significativamente por la acción del extracto de arándano rojo en las primeras horas de desarrollo del *biofilm in vitro*.

Es evidente que las enfermedades periodontales, principalmente la periodontitis, son desencadenadas por bacterias y que la presencia de bacterias específicas (bacterias patogénicas periodontales) tienen un papel relevante en el desarrollo de la periodontitis (Papapanou *et al.*, 2000, Socransky *et al.*, 1998, Socransky & Haffajee, 2005). En este sentido, la reducción cualitativa y cuantitativa de estas especies bacterianas patógenas es el objetivo principal del tratamiento periodontal, ya que su permanencia en el surco gingival está directamente asociada a la recurrencia y progresión de la periodontitis, tras el tratamiento periodontal (Listgarten, 1988, Rams & Slots, 1996, Haffajee & Socransky, 1994, Haffajee *et al.*, 2006). Debido al hecho de que la eliminación completa de las bacterias patogénicas periodontales - anaerobias facultativas como *A. actinomycetemcomitans* (Mombelli *et al.*, 1994, Slots & Rosling, 1983, Kornman & Robertson, 1985, Christersson *et al.*, 1985) y anaerobias obligatorias como *P. gingivalis* y *F. nucleatum* (Mombelli *et al.*, 2000) - no siempre es posible solamente con instrumentación manual, se crea la necesidad de coadyuvar el tratamiento periodontal mecánico con sustancias antimicrobianas eficaces (Herrera *et al.*, 2008, Herrera *et al.*, 2012), cuya limitación se asocia a sus efectos adversos (Serrano *et al.*, 2015).

Debido a la prescripción excesiva de los antibióticos, la resistencia bacteriana a los antibióticos se está convirtiendo en una creciente amenaza

para la salud, en todo el mundo. Varios autores han demostrado que hay extractos de plantas que tienen efectos antimicrobianos y *antibiofilm* considerables, sin poseer, en cambio, el riesgo significativo de producirse resistencias antibióticas. Han sido reconocidos una gran cantidad de fitoquímicos como una valiosa medicina alternativa y complementaria en el tratamiento de infecciones bacterianas (Daglia, 2012, Slobodnikova *et al.*, 2016).

Así, buscando solventar todas las limitaciones de las sustancias antimicrobianas referidas (efectos adversos y resistencias bacterianas a los antibióticos), el presente estudio analiza la capacidad antimicrobiana frente a seis especies bacterianas y el potencial de inhibir la formación de un *biofilm in vitro* que los extractos naturales de arándano rojo puedan presentar.

Los arándanos rojos son particularmente ricos en compuestos biológicamente activos, como son los ácidos fenólicos, que incluyen los flavonoides, las antocianinas, las proantocianidinas de tipo A (AC-PACs, por sus siglas en inglés) y los ácidos orgánicos (Pappas & Schaich, 2009). Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que distintos extractos/ fracciones/ compuestos de arándano rojo poseen propiedades antibacterianas contra diversas especies bacterianas patógenas (Gram-positivas y Gram-negativas) responsables de infecciones del tracto urinario y otras enfermedades sistémicas (Koo *et al.*, 2010, Nogueira *et al.*, 2003, Wojnicz *et al.*, 2016, Côté *et al.*, 2011). En este sentido, los resultados presentados por los estudios mencionados indican que los extractos de arándano rojo tienen una gran efectividad frente a las seis especies bacterianas que se estudiaron, en estado planctónico. No obstante, nuestros resultados contradicen lo que La *et al.*, (2010) describieron, ya que los mismos autores observaron que los AC-PACs no tuvieron ningún efecto en el crecimiento de *P. gingivalis* en estado planctónico. Esta divergencia en los resultados podría deberse a que el efecto antiséptico que hemos observado en nuestro estudio no proceda de los AC-PACs, pero si de alguno de los restantes componentes del arándano rojo, como los compuestos fenólicos.

Sin embargo, las bacterias se organizan mayoritariamente en *biofilms*, los cuales son comunidades sésiles que predominan en la mayoría de los hábitats ambientales, industriales y médicos (Costerton *et al.*, 1995). Lo mismo ocurre

en la cavidad oral, donde las bacterias organizadas en *biofilm* resisten a los mecanismos de defensa natural, así como a las defensas inmunitarias del huésped y a los agentes terapéuticos antimicrobianos (Mah & O'toole, 2001, Donlan & Costerton, 2002, Davies, 2003). De esta manera, surge la necesidad de estudiar los posibles efectos que los agentes antimicrobianos, anteriormente mencionados, puedan tener en las especies organizadas en *biofilm*.

A diferencia de otros estudios, en la presente investigación, el efecto antimicrobiano de los extractos de arándano rojo se probó sobre seis especies bacterianas en estado planctónico y sobre las mismas organizadas en un modelo validado de *biofilm in vitro* (Sanchez *et al.*, 2011).

Los resultados del presente estudio indican que, cuando las seis especies bacterianas están organizadas en *biofilms*, la vitalidad bacteriana es afectada por la exposición a los extractos de arándano rojo (20.000 µg/mL) durante 30 y 60 segundos. Sin embargo, aunque sea alcanzada una efectividad significativa contra los colonizadores primarios *S. oralis* (98,9% de reducción, tras 30 y 60 segundos de exposición; $p \leq 0,017$), *A. naeslundii* (65,7% de reducción, tras 30 segundos de exposición; $p = 0,006$) y *V. parvula* (66,7% de reducción, tras de 30 segundos de exposición; $p = 0,010$), nuestros resultados, de acuerdo con otros estudios, no mostraron un efecto significativo contra los patógenos periodontales *F. nucleatum* (75,3% de reducción, tras 60 segundos de exposición), *P. gingivalis* (39,3% de reducción, tras 60 segundos de exposición) o *A. actinomycetemcomitans* (11,5% de reducción, tras 60 segundos de exposición) ($p > 0,05$ para las tres especies bacterianas, después de 30 y 60 segundos de exposición al arándano rojo). Philip *et al.*, (2019), en una reciente investigación sobre los efectos inhibitorios que los extractos de frutos rojos podrían tener sobre la formación de *biofilms* de *S. mutans*, observaron que la vitalidad bacteriana en los *biofilms* no era afectada, tal como ya había descrito Koo *et al.*, (2006). Se sabe que los *biofilms* son una estructura compleja que posee una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos en comparación con las bacterias en estado planctónico (Bonifait & Grenier, 2010). Además, los *biofilms* presentan mayores densidades de biomasa y las bacterias que los constituyen tienen actividades metabólicas disminuidas, afectando así la efectividad de los agentes terapéuticos (Lewis, 2001).

Como tal, la reducción en la vitalidad bacteriana observada en nuestro estudio, aunque discreta, podría apoyar observaciones previas *in vivo*, las cuales mostraron que los extractos de arándano rojo (zumo concentrado de arándano rojo, en forma de gel termorreversible) tienen propiedades antimicrobianas contra *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (Gutiérrez *et al.*, 2017), pese que en nuestro estudio no se haya alcanzado un efecto significativo. De hecho, es posible que la variabilidad existente entre los resultados reportados en diferentes investigaciones *in vivo* e *in vitro* pueda deberse a los diferentes tipos de muestras y formulaciones de arándano rojo utilizadas.

Por otro lado, esta investigación destaca nuevas características relacionadas con la actividad *antibiofilm* de los extractos de arándano rojo frente a los patógenos periodontales. La adhesión bacteriana a las superficies orales es el paso principal de la patogénesis de la periodontitis. Los extractos de arándano rojo a una concentración de 200 µg/mL interfirieron significativamente en la colonización de las seis especies bacterianas, en el modelo de *biofilm in vitro*, principalmente en la incorporación de los patógenos periodontales *P. gingivalis* (reducción del 97,3%, en su incorporación), *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum* (reducción del 84,0% y 75,7%, en las superficies de los discos de HA, respectivamente) ($p < 0,001$ en todos los casos). Además, los colonizadores primarios fueron afectados, con reducciones alrededor del 98,9% para *S. oralis* ($p < 0,001$) y del 88,7% para *V. parvula* ($p < 0,001$), tras 6 horas de exposición al extracto de arándano rojo.

Varios estudios han investigado el papel de los componentes del arándano rojo en la adhesión bacteriana y en el desarrollo de *biofilms* (Philip *et al.*, 2019, Labrecque *et al.*, 2006, Yamanaka *et al.*, 2007, Yamanaka-Okada *et al.*, 2008, Polak *et al.*, 2013). Philip *et al.*, (2019) concluyeron que el extracto de arándano rojo es el extracto más eficaz en la perturbación de la integridad y la arquitectura estructural del *biofilm* de *S. mutans*, sin afectar significativamente la viabilidad bacteriana. En nuestro estudio, el análisis de CLSM demostró el efecto anti-adhesión del arándano rojo, en el modelo de *biofilm in vitro*. Además, se observó una perturbación significativa de la estructura del *biofilm*, la cual es consistente con los datos cualitativos obtenidos - reducción significativa de las UFC/mL viables de las especies bacterianas.

Labrecque *et al.*, (2006) y Yamanaka *et al.*, (2007) observaron que la fracción NDM de arándano rojo interfiere en la colonización de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, en el surco gingival. Además, la misma también previene la adhesión de *P. gingivalis* a varias proteínas, incluido el colágeno tipo I, reduciendo así la coagregación bacteriana, en las enfermedades periodontales (Labrecque *et al.*, 2006, Yamanaka *et al.*, 2007, Yamanaka-Okada *et al.*, 2008, Polak *et al.*, 2013). En la misma línea, Polak *et al.*, (2013) observaron que la fracción NDM del arándano rojo inhibe la adhesión de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* a las células epiteliales y que ratones que consumen la fracción de NDM, la gravedad de la periodontitis experimental es atenuada, en comparación con la misma infección mixta sin tratamiento con la fracción de NDM. Otro autor observó que la fracción de NDM incrementó la fagocitosis de *P. gingivalis*; restringió la actividad proteolítica de las bacterias del complejo rojo, en especial la actividad de gingipainas de *P. gingivalis*, la actividad de tripsina de *Tanarella forsythia* y la actividad de quimiotripsina de *T. denticola* (Bodet *et al.*, 2006b). Por otro lado, el mismo autor afirma que los macrófagos del huésped liberan citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α) tras la estimulación por lipopolisacáridos bacterianos de *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*. Otros estudios, como los de Bodet *et al.*, (2006a) y Polak *et al.*, (2013) reportaron que estas citoquinas eran inhibidas, ya que la fracción de NMD es capaz de eliminar la expresión de TNF- α promovida por los macrófagos que habían sido expuestos a *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, sin afectar a la viabilidad de los mismos macrófagos. La *et al.*, (2010) aunque hayan observado que los AC-PACs no tuvieron ningún efecto en el crecimiento de *P. gingivalis* en planctónico, sí que observaron que los AC-PACs inhibieron la formación de *biofilms*, lo que coincide con nuestros resultados de adhesión bacteriana.

En el presente estudio, se ha demostrado que la adhesión bacteriana a las superficies de los discos de HA, de las bacterias implicadas en el desarrollo de un *biofilm* subgingival *in vitro*, fue significativamente inhibida, incluso las bacterias patógenas implicadas en el desarrollo de las enfermedades periodontales (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los componentes del arándano rojo podrán interferir en la fase de adhesión bacteriana, incapacitando o

inhibiendo la adhesión de patógenos periodontales y, por lo tanto, evitar la colonización bacteriana y el desarrollo de las enfermedades periodontales. El efecto *antibiofilm* de los extractos de arándano rojo, en el presente estudio, podría atribuirse a la presencia de polifenoles, específicamente las proantocianidinas, una vez que estas inactivan la glucosiltransferasa y la fructosiltransferasa, enzimas esas que catalizan la formación de glucano y fructano, respectivamente, los cuales juegan un papel primordial en la formación y maduración de los *biofilms* (Bonifait & Grenier, 2010). También se observó que los polifenoles de los arándanos rojos inhibieron la formación del *biofilm* al interferir con la coagregación bacteriana (Weiss *et al.*, 2004), suponiéndose, así, que el arándano rojo reduzca uno de los síntomas de las enfermedades periodontales (inflamación gingival), pues al inhibir la adhesión de las bacterias a las superficies dentales, suprimirá las cascadas de inflamación como respuesta inmunológica a la invasión bacteriana (Weiss *et al.*, 2004).

En suma, este estudio aporta datos importantes que podrán ser utilizados en el futuro, en el manejo (prevención y tratamiento) de las enfermedades periodontales, una vez que hay evidencia de que los extractos naturales de arándano rojo no solamente tienen capacidad antibacteriana significativa frente a *S. oralis* y *A. naeslundii* (30 y 60 segundos de exposición) y *V. parvula* (30 segundos de exposición) organizadas en *biofilm*, sino que también tienen la capacidad de inhibir significativamente la incorporación de las seis bacterianas en el modelo de *biofilm in vitro* (6 horas de exposición). A pesar de las limitaciones de esta investigación, si nos enfocamos en el importante efecto *antibiofilm* observado del arándano rojo sobre las bacterias patógenas periodontales, estos resultados sirven de apoyo para el desarrollo de más estudios que evalúen el vehículo más efectivo y la concentración ideal de los extractos de arándano rojo a utilizar, sin causar efectos adversos a los tejidos orales.

En una perspectiva futura, de posible aplicación en la práctica clínica, tras la selección del mejor vehículo y la concentración ideal de los extractos de arándano rojo en estudios futuros *in vitro* e *in vivo*, de forma que se obtenga el máximo efecto *antibiofilm*, se propone la producción de un enjuague bucal que contenga, en su constitución, polifenoles oriundos de extractos de arándano

rojo, que podrá ser útil en el control, a largo plazo, de la carga bacteriana y, consecuentemente, de los niveles de inflamación en la cavidad oral, evitándose así los efectos adversos de los enjuagues con digluconato de clorhexidina, que, todavía, son el *gold-standard* en este campo. Por otro lado, la formulación de dispositivos de administración local, que contengan altas concentraciones de polifenoles del arándano rojo, pueden ser otra estrategia de implementar estas sustancias en la prevención o como coadyuvantes en el tratamiento de la periodontitis (Bunte *et al.*, 2019).

7. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación demuestran de que los extractos naturales de arándano rojo presentan capacidad antibacteriana discreta frente a seis especies bacterianas organizadas en *biofilm* y un potencial significativo de inhibir la incorporación de las mismas en un *biofilm*, en un modelo validado de *biofilm in vitro*.

De manera específica, se puede concluir que:

- De acuerdo con los datos de MICs y MBCs obtenidos, se puede afirmar que los extractos naturales de arándano rojo tienen las mejores propiedades antimicrobianas, contra los patógenos periodontales *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, en estado planctónico;
- Con respecto a la capacidad antibacteriana, los extractos de arándano rojo (20.000 µg/mL) provocaron reducciones significativas en las UFC/mL viables de *S. oralis* y *A. naeslundii*, en el modelo de *biofilm in vitro*, tras 30 y 60 segundos de exposición. Lo mismo se observó para *V. parvula*, a los 30 segundos de exposición;
- En relación a la capacidad *antibiofilm*, los extractos de arándano rojo (200 µg/mL) inhibieron significativamente la incorporación de las seis especies bacterianas en el modelo de *biofilm in vitro*, tras 6 horas de exposición, en comparación con los *biofilms* control. No obstante, en todos los casos, con excepción de *V. parvula*, se observaron diferencias significativas en la viabilidad causada por la solución de DMSO al 4%, en comparación con los *biofilms* control.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S. F. & Nabavi, S. M. (2017) Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research* **196**, 44-68.
- Beikler, T. & Flemmig, T. F. (2011) Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontology 2000* **55**, 87-103.
- Bodet, C., Chandad, F. & Grenier, D. (2006a) Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *Journal of Dental Research* **85**, 235-239.
- Bodet, C., Piché, M., Chandad, F. & Grenier, D. (2006b) Inhibition of periodontopathogen-derived proteolytic enzymes by a high-molecular-weight fraction isolated from cranberry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**, 685-690.
- Bonifait, L. & Grenier, D. (2010) Cranberry polyphenols: potential benefits for dental caries and periodontal disease. *Journal of the Canadian Dental Association* **76**, a130.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & Savelkoul, P. H. (2003) Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 4950-4954.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & Savelkoul, P. H. (2005) Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **45**, 191-199.
- Bunte, K., Hensel, A. & Beikler, T. (2019) Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Fitoterapia* **132**, 30-39.
- Buset, S. L., Walter, C., Friedmann, A., Weiger, R., Borgnakke, W. S. & Zitzmann, N. U. (2016) Are periodontal diseases really silent? A

- systematic review of their effect on quality of life. *Journal of Clinical Periodontology* **43**, 333-344.
- Chan, M., Hidalgo, G., Asadishad, B., Almeida, S., Muja, N., Mohammadi, M. S., Nazhat, S. N. & Tufenkji, N. (2013) Inhibition of bacterial motility and spreading via release of cranberry derived materials from silicone substrates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **110**, 275-280.
- Christersson, L. A., Slots, J., Rosling, B. G. & Genco, R. J. (1985) Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **12**, 465-476.
- Chung, S. Y., Song, K. B., Lee, S. G. & Choi, Y. H. (2011) The strength of age effect on tooth loss and periodontal condition in Korean elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **53**, e243-248.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995) Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**, 711-745.
- Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Dussault, D., Sylvain, J.-F. & Lacroix, M. (2011) Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control* **22**, 1413-1418.
- Dabholkar, C. S., Shah, M., Kathariya, R., Bajaj, M. & Doshi, Y. (2016) Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of Pomegranate-Containing Mouthwash Against Oral-Biofilm Forming Organisms: An In Vitro Microbial Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **10**, Zc65-69.
- Daglia, M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 174-181.
- Davey, M. E. & Costerton, J. W. (2006) Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontology 2000* **42**, 13-26.
- Davies, D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**, 114-122.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 167-193.

- Eke, P. I., Page, R. C., Wei, L., Thornton-Evans, G. & Genco, R. J. (2012) Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *Journal of Periodontology* **83**, 1449-1454.
- Eydelnant, I. A. & Tufenkji, N. (2008) Cranberry derived proanthocyanidins reduce bacterial adhesion to selected biomaterials. *Langmuir* **24**, 10273-10281.
- Feldman, M. & Grenier, D. (2012) Cranberry proanthocyanidins act in synergy with licochalcone A to reduce *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence properties, and to suppress cytokine secretion by macrophages. *Journal of Applied Microbiology* **113**, 438-447.
- Feldman, M., Tanabe, S., Howell, A. & Grenier, D. (2012) Cranberry proanthocyanidins inhibit the adherence properties of *Candida albicans* and cytokine secretion by oral epithelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12**, 6.
- Frencken, J. E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, D. & Dietrich, T. (2017) Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *Journal of Clinical Periodontology* **44 Suppl 18**, S94-S105.
- Gregoire, S., Singh, A., Vorsa, N. & Koo, H. (2007) Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1960-1968.
- Gutiérrez, S., Morán, A., Martínez-Blanco, H., Ferrero, M. A. & Rodríguez-Aparicio, L. B. (2017) The usefulness of non-toxic plant metabolites in the control of bacterial proliferation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **9**, 323-333.
- Gyawali, R. & Ibrahim, S. A. (2012) Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* **95**, 29-45.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* **5**, 78-111.
- Haffajee, A. D., Teles, R. P. & Socransky, S. S. (2006) The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology 2000* **42**, 219-258.

- Herrera, D., Alonso, B., León, R., Roldán, S. & Sanz, M. (2008) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 45-66.
- Herrera, D., Matesanz, P., Bascones-Martinez, A. & Sanz, M. (2012) Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *Journal of Evidence-Based Dental Practice* **12**, 50-60.
- Hidalgo, G., Chan, M. & Tufenkji, N. (2011) Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 *fliC* expression and motility by cranberry materials. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 6852-6857.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. & Rahu, N. (2016) Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 1-9.
- Jensen, H. D., Struve, C., Christensen, S. B. & Krogfelt, K. A. (2017) Cranberry juice and combinations of its organic acids are effective against experimental urinary tract infection. *Frontiers in Microbiology* **8**, 542.
- Koo, H., De Guzman, P. N., Schobel, B., Smith, A. V. & Bowen, W. (2006) Influence of cranberry juice on glucan-mediated processes involved in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Caries Research* **40**, 20-27.
- Koo, H., Duarte, S., Murata, R., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Watson, G., Singh, A. & Vorsa, N. (2010) Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo. *Caries Research* **44**, 116-126.
- Kornman, K. S. & Robertson, P. B. (1985) Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology* **56**, 443-446.
- Krayer, J. W., Leite, R. S. & Kirkwood, K. L. (2010) Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. *Dental Clinics of North America* **54**, 13-33.
- La, V. D., Howell, A. B. & Grenier, D. (2010) Anti-*Porphyromonas gingivalis* and anti-inflammatory activities of A-type cranberry proanthocyanidins. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **54**, 1778-1784.
- Labrecque, J., Bodet, C., Chandad, F. & Grenier, D. (2006) Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and

- adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**, 439-443.
- Lang, N. P. & Lindhe, J. (2015) *Clinical periodontology and implant dentistry, 2nd Volume Set*. John Wiley & Sons.
- Lewis, K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **45**, 999-1007.
- Lima, G. P. P., Vianello, F., Corrêa, C. R., Campos, R. A. d. S. & Borguini, M. G. (2014) Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Journal of Food and Nutrition Sciences* **5**, 1065-1082.
- Listgarten, M. A. (1988) Bacterial invasion of periodontal tissues. *Journal of Periodontology* **59**, 412-413.
- Mah, T.-F. C. & O'toole, G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9**, 34-39.
- Maisuria, V. B., Lopez-de Los Santos, Y., Tufenkji, N. & Déziel, E. (2016) Cranberry-derived proanthocyanidins impair virulence and inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports* **6**, 30169.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727-747.
- Marsh, P. D. (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research* **8**, 263-271.
- Marsh, P. D. (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology* **32 Suppl 6**, 7-15.
- Mombelli, A., Gmur, R., Gobbi, C. & Lang, N. P. (1994) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. *Journal of Periodontology* **65**, 820-826.
- Mombelli, A., Schmid, B., Rutar, A. & Lang, N. P. (2000) Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* **71**, 14-21.
- Muller, H. D., Eick, S., Moritz, A., Lussi, A. & Gruber, R. (2017) Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. *BioMed Research International* **2017**, 1-9.

- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A. & Hunter, N. (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* **148**, 257-266.
- Neto, C. C., Amoroso, J. W. & Liberty, A. M. (2008) Anticancer activities of cranberry phytochemicals: an update. *Molecular Nutrition & Food Research* **52**, S18-S27.
- Nogueira, M. C., Oyarzabal, O. A. & Gombas, D. E. (2003) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in cranberry, lemon, and lime juice concentrates. *Journal of Food Protection* **66**, 1637-1641.
- O'May, C., Ciobanu, A., Lam, H. & Tufenkji, N. (2012) Tannin derived materials can block swarming motility and enhance biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* **28**, 1063-1076.
- O'May, C. & Tufenkji, N. (2011) The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 3061-3067.
- Papapanou, P. N., Neiderud, A. M., Papadimitriou, A., Sandros, J. & Dahlen, G. (2000) "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *Journal of Periodontology* **71**, 885-897.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., Loos, B. G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G. J., Teles, R. & Tonetti, M. S. (2018) Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology* **45 Suppl 20**, S162-S170.
- Pappas, E. & Schaich, K. M. (2009) Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **49**, 741-781.

- Philip, N., Bandara, H., Leishman, S. J. & Walsh, L. J. (2019) Inhibitory effects of fruit berry extracts on *Streptococcus mutans* biofilms. *European Journal of Oral Sciences* **127**, 122-129.
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. (2005) Periodontal diseases. *The Lancet* **366**, 1809-1820.
- Polak, D., Naddaf, R., Shapira, L., Weiss, E. I. & Houry-Haddad, Y. (2013) Protective Potential of Non-Dialyzable Material Fraction of Cranberry Juice on the Virulence of *P. gingivalis* and *F. nucleatum* Mixed Infection. *Journal of Periodontology* **84**, 1019-1025.
- Rams, T. E., Degener, J. E. & van Winkelhoff, A. (2014) Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. *Clinical Oral Implants Research* **25**, 82-90.
- Rams, T. E. & Slots, J. (1996) Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontology 2000* **10**, 139-159.
- Sanchez, M., Llama-Palacios, A., Blanc, V., Leon, R., Herrera, D. & Sanz, M. (2011) Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research* **46**, 252-260.
- Sanchez, M. C., Marin, M. J., Figuera, E., Llama-Palacios, A., Leon, R., Blanc, V., Herrera, D. & Sanz, M. (2014) Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research* **49**, 20-28.
- Serrano, J., Escribano, M., Roldán, S., Martín, C. & Herrera, D. (2015) Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* **42**, S106-S138.
- Singh, A. P., Singh, R. K., Kim, K. K., Satyan, K., Nussbaum, R., Torres, M., Brard, L. & Vorsa, N. (2009) Cranberry proanthocyanidins are cytotoxic to human cancer cells and sensitize platinum-resistant ovarian cancer cells to paraplatin. *Phytotherapy research : an international journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives* **23**, 1066-1074.

- Slobodnikova, L., Fialova, S., Rendekova, K., Kovac, J. & Mucaji, P. (2016) Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules* **21**, 1-15.
- Slots, J. & Rosling, B. G. (1983) Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *Journal of Clinical Periodontology* **10**, 465-486.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28**, 12-55.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**, 135-187.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-144.
- Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I. & Weiss, E. I. (2005) Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* **25**, 247-251.
- Sun, J., Marais, J. P., Khoo, C., LaPlante, K., Vejborg, R. M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Seeram, N. P. & Rowley, D. C. (2015) Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides decrease biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Functional Foods* **17**, 235-242.
- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B. & Haffajee, A. (2013) Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000* **62**, 95-162.
- Tonetti, M. S., Van Dyke, T. E. & Workshop, W. G. o. t. J. E. A. (2013) Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, S24-S29.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.
- Ulrey, R. K., Barksdale, S. M., Zhou, W. & van Hoek, M. L. (2014) Cranberry proanthocyanidins have anti-biofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary Alternative Medicine* **14**, 499.

- Van Strydonck, D. A., Slot, D. E., Van der Velden, U. & Van der Weijden, F. (2012) Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 1042-1055.
- Van Winkelhoff, A., Herrera, D., Oteo, A. & Sanz, M. (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 893-898.
- Van Winkelhoff, A. (2012) Antibiotics in the treatment of peri-implantitis. *International Journal of Oral Implantology* **5 Suppl**, S43-S50.
- Weiss, E. I., Kozlovsky, A., Steinberg, D., Lev-Dor, R., Bar Ness Greenstein, R., Feldman, M., Sharon, N. & Ofek, I. (2004) A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters* **232**, 89-92.
- Wojnicz, D., Tichaczek-Goska, D., Korzekwa, K., Kicia, M. & Hendrich, A. B. (2016) Study of the impact of cranberry extract on the virulence factors and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* strains isolated from urinary tract infections. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **67**, 1005-1016.
- Yamanaka, A., Kimizuka, R., Kato, T. & Okuda, K. (2004) Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 150-154.
- Yamanaka, A., Kouchi, T., Kasai, K., Kato, T., Ishihara, K. & Okuda, K. (2007) Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **42**, 589-592.
- Yamanaka-Okada, A., Sato, E., Kouchi, T., Kimizuka, R., Kato, T. & Okuda, K. (2008) Inhibitory effect of cranberry polyphenol on cariogenic bacteria. *The Bulletin of Tokyo Dental College* **49**, 107-112.

Yan, X., Murphy, B. T., Hammond, G. B., Vinson, J. A. & Neto, C. C. (2002) Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5844-5849.

9. APÉNDICES

9.1. Divulgación de los resultados de esta investigación

9.1.1. Poster en congresos nacionales

1. **Evaluación del impacto del extracto de arándano rojo en la formación de un *biofilm*. Un estudio *in vitro*.**

David Simões Martins, María del Carmen Sánchez, Honorato Ribeiro-Vidal, Adelaida Esteban-Fernández, Begoña Bartolomé, Elena Figuero, María Victoria Moreno-Arribas, Mariano Sanz, David Herrera.
XVII Curso de metodología de investigación en Periodoncia y Osteointegración
Oviedo, 22 e 23 de febrero de 2019

9.1.2. Comunicaciones orales en congresos nacionales e internacionales

2. **Evaluación del impacto del extracto de arándano rojo en la formación de un *biofilm*. Un estudio *in vitro*.**

David Simões Martins, María del Carmen Sánchez, Honorato Ribeiro-Vidal, Adelaida Esteban-Fernández, Begoña Bartolomé, Elena Figuero, María Victoria Moreno-Arribas, Mariano Sanz, David Herrera.
XVII Curso de metodología de investigación en Periodoncia y Osteointegración
Oviedo, 22 e 23 de febrero de 2019

3. **Impact of Cranberry Extract in Bacterial Vitality in *Biofilm* Model**

David M. Simões e Martins, María Sánchez-Beltrán, Honorato Ribeiro-Vidal, Adelaida Esteban-Fernández, Begoña Bartolomé, Elena Figuero, María Victoria Moreno-Arribas, Mariano Sanz, David Herrera
CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress 2019
Madrid, 19 - 21 de septiembre de 2019
(*Sometido para revisión*)

4. **Cranberry Extract Reduces Adhesion of Pathogens in *in vitro***

Biofilms

María Sánchez-Beltrán, David M. Simões e Martins, Honorato Ribeiro-Vidal, Begoña Bartolomé, Elena Figuro, María Victoria Moreno-Arribas, María Victoria Moreno-Arribas, Mariano Sanz, David Herrera

CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress 2019

Madrid, 19 - 21 de septiembre de 2019

(Sometido para revisión)

9.2. Abreviaturas

A. a / **A. actinomycetemcomitans**: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. n / **A. naeslundii**: *Actinomyces naeslundii*

AC – PACS: *A-type proanthocyanidins* (Proantocianidinas de tipo A)

BHI: *Brain-Heart Infusion* (Infusión cerebro-corazón)

CIAL: Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

CHX: Digluconato de clorhexidina

CLSM: *Confocal laser scanning microscopy* (Microscopía de barrido laser confocal)

Cq: ciclo de cuantificación

Ct: Umbral del ciclo

DMSO: *Dimethyl sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)

DS / SD: Desviación estándar / *Standard deviation*

EGCG: *Epigallocatechin gallate* (Galato de epigallocatequina)

ETEP: Etiología y Terapéutica de las Enfermedades Periodontales

F. n / **F. nucleatum**: *Fusobacterium nucleatum*

HA: Hidroxiapatita

IP: Ioduro de propidio

Log: logaritmo

MBC: *Minimum bactericidal concentration* (Concentración mínima bactericida)

MIC: *Minimum inhibitory concentration* (Concentración mínima inhibitoria)

NMD: *Non-dialyzable constituent fraction of cranberry* (Fracción no dializable del arándano rojo)

PBS: *Phosphate buffer saline* (Solución salina tamponada con fosfato)

P. g / **P. gingivalis**: *Porphyromonas gingivalis*

PMA: *Propidium monoazide* (Propidio de monoazida)

qPCR: *Quantitative real-time polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real)

S. o / **S. oralis**: *Streptococcus oralis*

UFC/mL / CFU/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro / Colony forming units per milliliter

V. p / **V. parvula**: *Veillonella parvula*

9.3. Índice de Tablas

Tabla 1 - Cepas seleccionadas y colección de cultivo.....	9
Tabla 2 - Cepas seleccionadas y su concentración final en el preinóculo.....	13
Tabla 3 - Secuencias de los cebadores y sondas utilizados para la detección y cuantificación del ADN genómico de las bacterias involucradas en el desarrollo del <i>biofilm</i> . En todos los casos, los cebadores y las sondas se han dirigido al gen 16S rRNA (Sánchez et al., 2014).	17
Tabla 4 - Efecto antimicrobiano del extracto de arándano rojo en el número medio de bacterias viables (expresado en UFC/mL) y su desviación estándar (DS) de cada especie bacteriana en los <i>biofilms in vitro</i> , obtenidas por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).	25
Tabla 5 - Efecto inhibitorio en la formación de <i>biofilm</i> , de los extractos de arándano rojo, reflejado en el número medio de bacterias (expresado en UFC/mL), incorporadas en el <i>biofilm in vitro</i> de 6 horas, formado sobre las superficies de los discos de HA. Estos datos fueron obtenidos por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).	29

9.4. Índice de Figuras

Figura 1 - Clasificación de los polifenoles y sus compuestos representativos. Adaptado de Bunte <i>et al.</i> , (2019).	3
Figura 2 – Características de la estructura química de los flavonoides (A), antocianidinas (B), proantocianidinas (C), ácido cinámico (D) y derivados del ácido benzoico (E). Tomado de Bunte <i>et al.</i> , (2019).....	4
Figura 3 - Curvas de crecimiento de las especies bacterianas utilizadas en el modelo validado de <i>biofilm in vitro</i> por Sanchez <i>et al.</i> , (2011).....	10
Figura 4 - Espectrofotómetro. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.....	11
Figura 5 - Representación esquemática de la preparación del modelo de <i>biofilm</i> subgingival multi-especies <i>in vitro</i> , según Sanchez <i>et al.</i> , (2011).	14
Figura 6 - Representación esquemática de la preparación del modelo de <i>biofilm</i> subgingival multi-especies <i>in vitro</i> , según Sanchez <i>et al.</i> , (2011), para evaluar la capacidad anti-adhesión bacteriana de los extractos de arándano rojo.	15
Figura 7 – Representación de los <i>box plot</i> del efecto en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) viables de las seis especies bacterianas (<i>So</i> – <i>Streptococcus oralis</i> ; <i>An</i> – <i>Actinomyces naeslundii</i> ; <i>Vp</i> – <i>Veillonela parvula</i> ; <i>Aa</i> – <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ; <i>Pg</i> - <i>Porphyromonas gingivalis</i> ; <i>Fn</i> – <i>Fusobacterium nucleatum</i> , organizadas en <i>biofilm</i> , del: (A – F) tratamiento con el extracto de arándano rojo (20.000 µg/mL), tras 30 y 60 segundos de exposición; (G – M) tratamiento del extracto de arándano rojo (20.000 µg/mL) respecto a los controles negativos solución salina tamponada con fosfato (PBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%, tras 60 segundos de exposición.....	26
Figura 8 - Proyección máxima de imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los <i>biofilms</i> de 72 h, donde se observa el crecimiento de esos <i>biofilms</i> sobre las superficies de los discos de HA, teñidas con LIVE/DEAD® <i>BacLight™ Bacterial Viability Kit</i> , tras 30 y 60 segundos de exposición: (A, B) al control negativo (solución salina tamponada con fosfato, PBS), respectivamente; (C, D) a la solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%,	

respectivamente; (E, F) a los extractos de arándano rojo (concentración de 20.000 µg/mL), respectivamente.....28

Figura 9 - Representación de los *box plot* del efecto en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de las seis especies bacterianas (*So* – *Streptococcus oralis*; *An* – *Actinomyces naeslundii*; *Vp* – *Veillonella parvula*; *Aa* – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg* - *Porphyromonas gingivalis*; *Fn* – *Fusobacterium nucleatum*), organizadas en biofilm, del tratamiento con el extracto de arándano rojo (200 µg/mL), respecto a los controles negativos solución salina tamponada con fosfato (PBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%, tras 6 horas de exposición.....30

Figura 10 - Proyección máxima de imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los *biofilms* de 6 horas, expuestos a una solución de arándano rojo (200 µg/mL), donde se observa el crecimiento de esos *biofilms* sobre las superficies de los discos de HA, teñidos con el Kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability, tras la exposición: (A,B) al control negativo (solución salina tamponada con fosfato, PBS); (C,D) a la solución de arándano rojo; (E,F) a la solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%.31