



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE

BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA

VEGETAL

Efecto antibacteriano de nanopartículas PolymP-n Active sobre la formación de biopelículas de bacterias orales en discos de titanio.

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: Lidia Lázaro Jiménez

Tutor: Mariano Sanz Alonso

Julio de 2020



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS POLYMP-N ACTIVE
SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE BACTERIAS ORALES EN
DISCOS DE TITANIO.**

TRABAJO FIN DE GRADO

Lidia Lázaro Jiménez

MADRID, 2020

Director: Mariano Sanz Alonso.
Dpto. de Especialidades Clínicas Odontológicas (DECO).
Universidad Complutense de Madrid, facultad de Odontología.



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**TITULO DEL TFG- EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS POLYMP-N ACTIVE
SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE BACTERIAS ORALES EN DISCOS DE TITANIO.**

**Memoria presentada por LIDIA LÁZARO JIMÉNEZ para la obtención del título de
Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

Fdo:

VºBº Tutor.

**D. Mariano Sanz Alonso.
Dpto. de Especialidades Clínicas Odontológicas (DECO).
Universidad Complutense de Madrid, facultad de Odontología.**

VºBº Tutora UPM.

**Dª Begoña Benito Casado
Dpto de Biotecnología- Biología Vegetal.
ETSIAAB - Universidad Politécnica de Madrid.**

Madrid, 8 de julio de 2020.

ÍNDICE GENERAL.

CAPÍTULO 1. Introducción.....	1
1.1 La cavidad oral.....	1
1.2 Nichos microbianos en la cavidad oral.....	2
1.3 Comunidades y formación de biopelícula oral.....	4
1.4 Enfermedades orales y microbiota.	6
1.5 Tratamientos antibacterianos.	10
1.6 Implantología y nuevas opciones de tratamiento.....	11
CAPÍTULO 2. Materiales y métodos.	16
2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	16
2.2 Preparación de nanopartículas.....	16
2.3 Preparación de los discos de titanio.	16
2.4 Formación de la biopelícula.....	17
2.5 Evaluación de biomasa de la biopelícula.	18
2.6 Análisis estadístico.....	20
CAPÍTULO 3. Resultados.....	21
CAPÍTULO 4. Discusión.	23
CAPÍTULO 5. Conclusión.....	25
CAPÍTULO 6. Bibliografía.	26
APÉNDICES.	A

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 - Cebadores y sondas usadas para la cuantificación de biomasa bacteriana a través de qPCR. Los cebadores y sondas están dirigidos al gen ARNr 16S de cada especie..... 19

Tabla suplementaria 1 - Número de bacterias (Medias + desviación estándar) de *S. oralis* (So), *A. naeslundii* (An), *V. parvula* (Vp), *F. nucleatum* (Fn), *A. actinomycetemcomitans* (Aa) y *P. gingivalis* (Pg) crecidas en una biopelícula in vitro a diferentes tiempos de incubación, medidas por qPCR, sobre discos de titanio dopados con tampón fosfato salino (PBS) como control, y con dos tipos de nanopartículas (NPs): NPs Active y NPs Active dopadas con doxiciclina (N=3 para cada tiempo de incubación). A

Tabla suplementaria 2 - Test post hoc de ANOVA T3 de Dunnett (N=3 para cada tiempo de incubación)..... C

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 - Representación esquemática de las fases de la formación de una biopelícula oral. Basado en el trabajo de Verma D, Garg PK, Dubey AK. 2018. (12).	5
Figura 2 - Representación esquemática de la agrupación de las bacterias orales basada en clústeres evolutivos con distintos colores basado en Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C & Kent RL. 1998. Socransky SS & Haffajee AD. 2005. (19).	7
Figura 3 - Representación de la evolución de la enfermedad periodontal. Inicialmente es una inflamación reversible con bacterias patógenas, que posteriormente evoluciona a una periodontitis con una inflamación crónica debido a una disbiosis de la biopelícula, con más patógenos, lo que lleva a la destrucción de tejidos periodontales. Hajishengallis G. 2015. (27). 9	9
Figura 4 - Imagen de un implante dental recubierto con una biopelícula que produce una peri-implantitis obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Arweiler NB, Netuschil L. 2016. (46).	12
Figura 5 - Imágenes de nanopartículas poliméricas PolymP-n Active obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Osorio R, Osorio E, Medina-Castillo AL & Toledano M. 2014. (57).	15
Figura 6 - Discos de titanio en placas de 24 pocillos inoculados con la mezcla de las cepas bacterianas.	18
Figura 7 - Número de bacterias crecidas en biopelículas in vitro a diferentes tiempos de incubación sobre discos de titanio dopados con tampón fosfato salino (PBS) como control, y con dos tipos de nanopartículas (NPs): NPs Active y NPs Active dopadas con doxiciclina (Doxy), para cada cepa bacteriana. Cepas colocadas en orden de colonización A) y B) primarios, C) temprano D) secundario E) y F) tardíos. (N=3 para cada tiempo de incubación). * Diferencias significativas comparado con el control ($p<0,05$).	22

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

- So: *Streptococcus oralis*.
- An: *Actinomyces naeslundii*.
- Vp: *Veillonella parvula*.
- Fn: *Fusobacterium nucleatum*.
- Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- Pg: *Porphyromonas gingivalis*.
- LPS: Lipopolisacárido.
- ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- ADD: Ácido desoxirribonucleico.
- TLR: Toll-like receptors o receptores de tipo Toll.
- CDT: Toxina citoletal distendida.
- SEM: Microscopía electrónica de barrido.
- TESPSA: Anhídrido trietoxisililpropil succínico.
- PVD: Deposición física de vapor.
- NPs: Nanopartículas.
- COO⁻: Carboxilato.
- SLA: Sand-blasted, Large grit, Acid-etched.
- Ti-SLA: Titanio-SLA.
- BHI-2: Brain-heart infusion 2.
- rpm: Revoluciones por minuto.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- DO: Densidad óptica.
- qPCR: PCR cuantitativa.
- Cq: Ciclo de cuantificación.
- Doxy: Doxiciclina.
- CLSM: microscopía de escaneo láser confocal.

RESUMEN.

The oral cavity is considered the second region of the human body behind the colon, which contains the most complex microbiota. The bacteria that make up the oral microbiota, tend to form biofilms around periodontal tissue to survive. The formation of biofilms in the oral cavity can suffer an imbalance of the microbiota due to different factors, which can lead to a chronic inflammatory disease, called periodontitis, which leads to the loss of teeth due to the destruction of the oral tissues around them. Once this occurs, the use of a dental implant, usually made of titanium, is required to replace the lost teeth. The problem resides when the continuous inflammation ends up causing the destruction of the tissues with the loss of the implant, developing the so-called peri-implantitis. The antimicrobial effect of titanium disc coated by two types of nanoparticles: PolymP-n Active and Active doped with doxycycline, was examined, against an *in vitro* biofilm composed of *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, representing bacteria commonly found in the mouth, during different incubation times (12, 24, 48 and 72 hours). Quantitative real-time PCR analysis was performed to assess bacterial load. It is shown that Active nanoparticles doped with doxycycline, produce a significant reduction in the number of bacteria in all species that make up the biofilm, except *Porphyromonas gingivalis*, being the latest to form the biofilm, where doxycycline does apparently does not reach. On the other hand, Active nanoparticles have not shown any significant antibacterial effect.

CAPÍTULO 1. Introducción.

A pesar de que las estimaciones de los ratios microorganismos/células humanas que integran el cuerpo están variando enormemente (durante un tiempo se hablaba de 1:10, más recientemente de 1,3/1), un alto porcentaje de células del cuerpo humano son microbianas (1). Estas células tienen funciones importantes en nuestro cuerpo, como facilitar la absorción de nutrientes, la síntesis de vitaminas o la protección contra infecciones. El cuerpo humano tiene muchos nichos ecológicos donde se permite la colonización de diferentes especies microbianas. Uno de estos nichos es la cavidad oral, que tiene las condiciones perfectas para el crecimiento microbiano, ya que es una cavidad húmeda y caliente donde llega un gran aporte de nutrientes que facilitan su desarrollo (2).

1.1 La cavidad oral.

La cavidad oral está considerada como la segunda región del cuerpo humano por detrás del colón, que contiene la microbiota más compleja. La microbiota oral es muy diversa, ya que contiene bacterias, hongos, virus, protozoos y arqueas. El grupo más abundante son las bacterias, entre las que se han llegado a identificar aproximadamente unas 700 especies bacterianas, siendo la mayoría indígenas o nativas de esta cavidad (3).

Inicialmente, la caracterización de las especies bacterianas presentes en la cavidad oral se realizaba por métodos tradicionales como son la obtención de cultivos puros en el laboratorio o por microscopía, encontrándose grandes diferencias en el número de bacterias por muestra dependiendo del método utilizado. Esto era debido a que más del 50% de las especies bacterianas no son cultivables en el laboratorio (4), ya que muchas de ellas requieren unas condiciones de nutrientes, pH y temperatura únicas para sobrevivir, que todavía no han sido reproducidas en el laboratorio, a parte de que, en algunos casos se ha visto que incluso necesitan estar interactuando con otras especies (3). Más recientemente han aparecido métodos moleculares, que están permitiendo la caracterización de la microbiota sin necesidad de su aislamiento y cultivo previo en el laboratorio de la población microbiana existente, gracias a los cuales ha aumentado el conocimiento de más especies orales. Estos métodos están basados principalmente en la amplificación, clonación y secuenciación del gen de ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S (2–7). Esta nueva técnica permitió en el año 2010 la creación de una base de datos llamada “The Human Oral Microbiome Database (HOMD)” donde se recogen todas las

secuencias del gen ARNr 16S de todas las especies que componen el microbioma oral y sus características (8). Con el uso de esta técnica, se han ido desarrollando otras nuevas, como hibridaciones de alto rendimiento y microarrays, que están permitiendo detectar un gran número de especies bacterianas orales por muestra (2, 5).

1.2 Nichos microbianos en la cavidad oral.

La cavidad oral, o boca, incluye varios hábitats microbianos distintos, como son los dientes, surco gingival, encía adherida, lengua, mejilla, labio, paladar duro y paladar blando (8), donde los microorganismos están protegidos del estrés mecánico y ambiental de la boca, como la masticación, el cepillado de dientes... (2). Este rango de hábitat limitado indica la crucial importancia de las interacciones entre las diferentes especies y con el entorno para su existencia (6). Todos estos hábitats generan varios nichos diferentes, donde cada uno aporta un ecosistema único y especial con las condiciones ambientales y de nutrientes óptimos para atraer a diferentes comunidades microbianas. Estos nichos son la saliva, superficies de tejido duro de los dientes y superficies de tejido blando de la lengua y la mucosa oral (3, 9).

- Saliva:

La saliva es un fluido de la boca que no tiene microorganismos propios o nativos, debido por un lado a que en ella hay pocos nutrientes y por otro porque el tiempo que pasa la saliva en la boca antes de la deglución, es relativamente corto. Eso impide el crecimiento bacteriano y posterior colonización (6). Sin embargo, en ella existen microorganismos que normalmente provienen del desprendimiento de las biopelículas que se forman en los tejidos orales blandos, como la lengua, por la descamación de sus superficies epiteliales. Esto significa que el perfil microbiano de la saliva es muy similar al de los tejidos blandos, como la lengua (3, 6). Además, la saliva tiene péptidos antimicrobianos y proteínas, como por ejemplo la lisozima, defensinas, lactoperoxidasas... (7, 10), que promueven el desprendimiento de las bacterias de las biopelículas que serán tragadas junto con la saliva. Esto se ha demostrado en pacientes con hiposalivación, que tenían mayor proporción de microorganismos acidogénicos y acidúricos, que llevaba a la aparición de enfermedades orales como caries o incluso cáncer. Esto ha llevado a pensar en el gran potencial que tiene el patrón microbiano de la saliva como marcador pronóstico para distintas enfermedades (3).

- Superficies de tejido blando:

Las mejillas, el paladar, y la lengua son los nichos considerados como superficies de tejido blando de la cavidad oral. La formación de biopelículas en estas superficies es limitada, debido a la descamación constante de las capas superficiales que tiene lugar en el epitelio, que se lleva con ella cualquier biopelícula inicialmente originada. De hecho, en el paladar y las mejillas solo se llega a formar una capa de biopelícula. Sin embargo, curiosamente en la lengua tiene varias capas de biopelícula (3). Esto es debido a que la lengua tiene una topografía diferente a las otras superficies blandas, estando recubierta por papilas en las zonas dorsal y lateral, en donde es posible la colonización de bacterias anaerobias, que pueden ser causantes de la halitosis (3, 6).

- Superficies de tejido duro:

Los dientes constituyen las llamadas superficies de tejido duro. Es una superficie que no se descama, y por tanto permite la formación de biopelículas duraderas (3, 6). Al igual que la saliva tenía proteínas que promovían el desprendimiento de microorganismos de las superficies blandas, también existen otras proteínas que se adsorben al esmalte dental y crean la película salival, que son principalmente glicoproteínas (10), que sirven como base de anclaje para la formación de la biopelícula (6). A partir de esto, se formará la llamada "placa dental", que es una biopelícula estructural y funcionalmente organizada sobre la superficie del diente, y que está embebida en una matriz de polímeros de origen microbiano y salivar (3, 4, 7, 11). Hay dos tipos de placas dentales según donde se localicen: la supragingival, por encima de la encía, y la subgingival, por debajo de la encía. Además de la localización, también se diferencian en la comunidad bacteriana que sustentan. En la placa supragingival, predominan bacterias Gram positivas, que producen ácido, y al que ellas son resistentes, pero que aumenta la susceptibilidad a la aparición de caries; mientras que en la placa subgingival (a lo largo de la raíz del diente) hay menos saliva y aparecen microorganismos anaerobios (3).

La placa dental supragingival puede variar en cuanto a su composición microbiana lo largo del tiempo de manera que aunque inicialmente está compuesta predominantemente por bacterias Gram positivas que causan la enfermedad oral, a medida que va avanzando la enfermedad, la microbiota cambia a una con mayor predominancia de bacterias Gram negativas, concretamente de especies anaerobias, pareciéndose más a la placa subgingival (11).

1.3 Comunidades y formación de biopelícula oral.

La formación de la biopelícula de las placas dentales tiene lugar en una serie de etapas ordenadas que llevan a una organización específica desde el punto de vista estructural y funcional. Este proceso puede dividirse en las siguientes fases (4) que se muestra en la **Figura 1**:

- Formación de la película de acondicionamiento: donde se produce la adsorción de diferentes moléculas sobre la superficie del diente limpio. Estas moléculas vienen de la saliva, como se ha dicho anteriormente, formando la película salivar en la zona supragingival (6), o también puede venir del líquido crevicular gingival, que es el líquido que se produce en el surco gingival, entre la encía y el diente, formando la biopelícula en la zona subgingival (4). Estas moléculas permiten el acondicionamiento de la superficie para la adhesión posterior de las bacterias, ya que éstas no pueden adherirse por sí solas a una superficie limpia (4, 6, 7). Las moléculas de la saliva son principalmente glicoproteínas y proteínas ricas en prolina (7, 12). Y las moléculas del líquido gingival son aglutininas y proteínas ricas en prolina, histidina y tirosina (7).
- Adhesión de colonizadores iniciales: existen dos tipos de adhesión, la reversible, que está caracterizada por interacciones débiles (fuerzas electrostáticas, de Van der Waals, e hidrofóbicas) entre las cargas de la pared celular de las bacterias y las moléculas de la película de acondicionamiento, y la irreversible, donde se produce la unión específica de las bacterias con las moléculas a través de adhesinas en su superficie (4, 7). Los colonizadores primarios son principalmente especies bacterianas Gram positivas de los géneros de *Actinomyces* y *Streptococcus*. Inicialmente se unen especies de *Streptococcus* como *S. gordonii*, *S. mutans* y *S. oralis*, una vez unidas a la superficie, producen unas adhesinas, que son los antígenos I y II, que permiten la interacción con *Actinomyces naeslundii*, bacteria frecuentemente presente en la boca (6, 7, 9, 12). Seguidamente, aparecen los colonizadores tempranos Gram negativos anaerobios, como *Veillonella parvula*, que junto a la agrupación con otras bacterias anaerobias facultativas (13), ofrecen un hábitat localizado libre de oxígeno adecuado para el crecimiento de especies anaerobias que se unirán posteriormente (4, 12).
- Co-adhesión o Co-agregación: en esta etapa se produce la unión de colonizadores secundarios y tardíos. En varios estudios se ha visto que los colonizadores iniciales no tienen

una gran capacidad de agregarse con los tardíos, por lo que esta unión debe estar llevada a cabo por otras bacterias, que son los colonizadores secundarios, como es el caso de *Fusobacterium nucleatum*, que actúa como puente entre los colonizadores tempranos y los tardíos, por lo tanto es crítico para la formación de la biopelícula madura que genera enfermedades periodontales (5, 6, 9, 12). Y por último, se da la agregación de los colonizadores tardíos, que son principalmente *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (7, 11), que son organismos patogénicos causantes de enfermedades orales, ya que generan productos tóxicos como endotoxinas, amoniaco, leucotoxinas y otras enzimas que producen la destrucción de los tejidos periodontales (14).

- Multiplicación y crecimiento de la biopelícula: las bacterias empiezan a multiplicarse lo que aumenta el espesor de la biopelícula, y para que éste se mantenga, comienzan a sintetizar exopolímeros o polisacáridos extracelulares para formar una matriz que retenga las células y aumente la tolerancia a factores externos como enzimas, antibióticos, o el sistema inmune. La composición de la matriz generada depende de la composición de la biopelícula (4, 7, 12).
- Desprendimiento de la biopelícula: las bacterias son capaces de reconocer cambios en el entorno, por lo que en determinadas condiciones, producen enzimas que favorecen el desprendimiento de algunas células de la biopelícula para poder buscar otro lugar más favorable para colonizar (4).

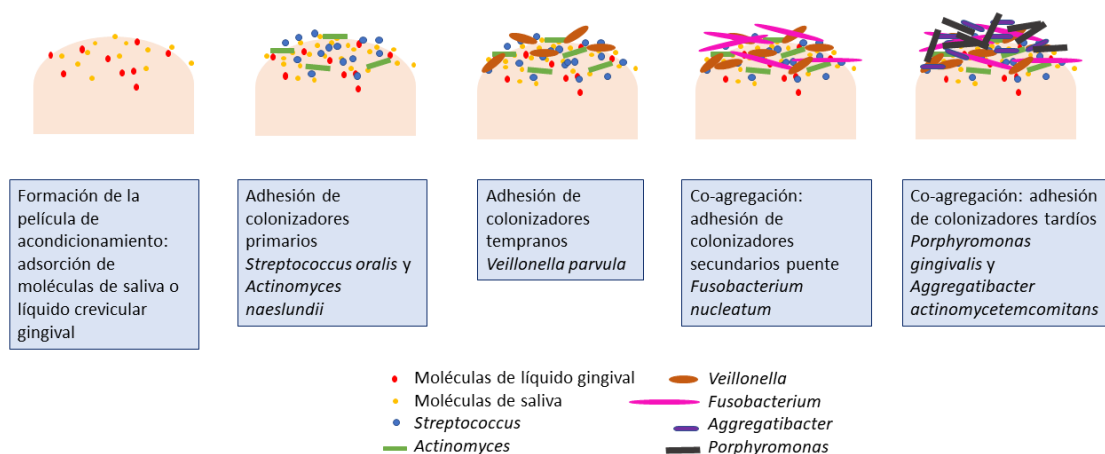


Figura 1 - Representación esquemática de las fases de la formación de una biopelícula oral. Basado en el trabajo de Verma D, Garg PK, Dubey AK. 2018. (12).

Una vez formada la biopelícula, ésta debe tener la capacidad de mantenerse en el tiempo, y esto lo realizan mediante la producción de una matriz de polisacáridos como se ha explicado anteriormente. Esta matriz además de mantener la estructura de la biopelícula, también ayuda en la retención de nutrientes, agua y otras enzimas que secreten las bacterias (4). Se ha visto que en la biopelícula madura, las bacterias están formando microcolonias y están separadas por unos pequeños canales, que están rellenos de líquidos por donde se distribuyen los nutrientes, oxígeno, sustancias de desecho... creando una comunicación entre las células de la biopelícula (7), y formando una especie de cadena alimentaria entre éstas (4). La primera fuente de nutrientes son los sustratos endógenos presentes en la biopelícula, y luego también pueden venir de la comida ingerida, aunque en menor medida, por lo que las bacterias inicialmente deben competir por los nutrientes. Las bacterias generan enzimas que hidrolizan polisacáridos para generar azúcares que sirvan de alimento (12). Además, se ha visto que esta degradación de las macromoléculas mayoritariamente solo tiene lugar cuando las bacterias se encuentran asociadas en estas colonias o comunidades, donde cada una participa de manera diferente generando esa cadena alimentaria, para llegar a los sustratos utilizables más sencillos, como metano, dióxido de carbono, hidrógeno, amoníaco (4).

1.4 Enfermedades orales y microbiota.

El ecosistema oral se encuentra en equilibrio en personas sanas, sin embargo, cuando ese equilibrio se altera, es cuando aparecen las enfermedades orales. Este desequilibrio puede ser debido a factores externos que generan cambios en la microbiota, factores del ambiente, como la dieta, tabaco y alcohol, estrés, higiene, enfermedades como la diabetes, alteraciones del sistema inmune... (4, 12, 13). Se ha visto que las enfermedades orales no suelen estar producidas por un único microorganismo sino por acción de la microbiota en su conjunto (4, 6, 15). Según se ha descrito, esta asociación de los microorganismos se basa en la agrupación en clústeres evolutivos que en la **Figura 2** se muestran en distintos colores (16):

- Grupo rojo, asociado con las enfermedades orales. Está compuesto por *Tannarella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*. (4, 6, 11, 17, 18).
- Grupo naranja, se considera como el puente entre la microbiota sana y la enfermedad, es un grupo de transición. Está integrado por *Fusobacterium nucleatum*, *F. periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Peptostreptococcus micros*, y un grupo de

bacterias asociadas a ellas, como *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *C. showae* y *C. gracilis*, y *Streptococcus constellatus* (6).

- Grupo amarillo, están asociados a microbiotas sanas. Aquí estarían incluidos *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* y *S. intermedius*. (6).
- Grupo verde: *Capnocytophaga gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo a.
- Grupo morado: *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.
- Sin grupo o outliers: *Actinomyces naeslundii*, *Selemonas noxia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b.

El cambio de una microbiota sana a una desequilibrada precursora de enfermedades, está seguido de una inflamación aguda, que lleva a la destrucción de los tejidos, generando nutrientes que permitirán la proliferación de bacterias patogénicas, creando así un ciclo de amplificación, que tras un tiempo determinado evolucionará a una destrucción mayor de tejido y por lo tanto a la complicación de la enfermedad (15).

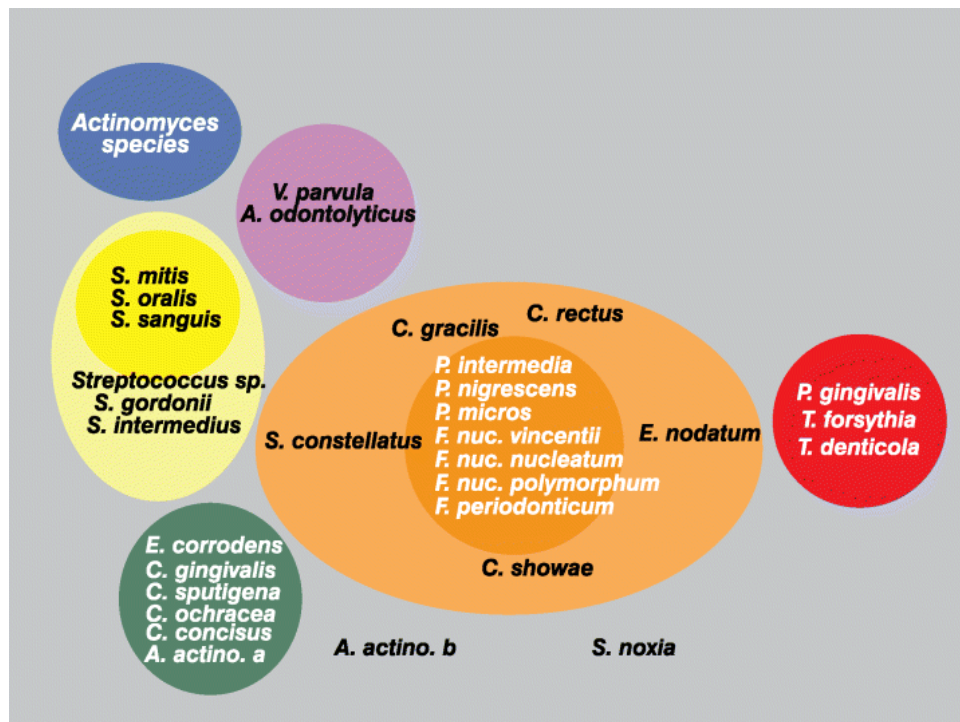


Figura 2 - Representación esquemática de la agrupación de las bacterias orales basada en clústeres evolutivos con distintos colores descrito en Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C & Kent RL. 1998. Socransky SS & Haffajee AD. 2005. (19).

Las enfermedades orales más comunes son:

- Caries dentales.

Es la enfermedad oral más común, sobre todo en niños, y es la causa principal del dolor de boca y caída de los dientes. Las caries se forman por dos factores que deben darse a la vez, uno es la ingesta de grandes cantidades de carbohidratos fermentables, como sacarosa, y la presencia de bacterias acidogénicas. Estas bacterias fermentan los carbohidratos produciendo ácidos, que van a disminuir el pH, induciendo así un cambio en la composición la microbiota, con mayor proporción de estas bacterias (3, 7, 15, 20). Estas bacterias van a producir la desmineralización de los cristales de hidroxiapatita que constituye el 95% del esmalte del diente (7, 15). Las principales bacterias que se han asociado a esta enfermedad son *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, pero también se ha visto que hay otras que ayudan a la progresión, aunque no sean tan abundantes, como *Bifidobacterium* (3, 4, 11, 18), y también especies de hongos como *Candida albicans*, que producirán ácidos y contribuirán a la disminución del pH (12, 18).

A priori, la presencia de las bacterias acidogénicas no indican una caries, ya que hay otras bacterias que neutralizan el pH ácido produciendo amonio, urea o arginina, y esto permite la remineralización y que no se progrese a una caries (3, 7, 15).

- Gingivitis.

Es la enfermedad oral más común en adultos. Consiste en una inflamación causada por bacterias presentes en la biopelícula que se forma cerca de las encías, representado en la **Figura 3**. La biopelícula evoluciona a una composición principalmente de bacterias Gram negativas y anaerobias (11). Entre las bacterias que más se ha visto relacionadas con esta enfermedad son especies de los géneros *Streptococcus*, *Veillonella*, y *Prevotella*. Si no se trata a tiempo, la biopelícula seguirá creciendo y evolucionará a una periodontitis (3).

- Periodontitis.

Se caracteriza por una inflamación irreversible y crónica que cursa con la caída de los dientes debido al desgaste o destrucción de los tejidos y las estructuras de soporte del diente, que son el cemento, el ligamento periodontal y el hueso, como se muestra en la **Figura 3** (3, 20, 21). Como en la gingivitis, la biopelícula aumenta su proporción en bacterias Gram negativas y anaerobias, sobre todo las pertenecientes a los grupos rojo mostrados en la **Figura 2**, principalmente *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* y algunos del grupo naranja (3, 4, 6,

11, 15, 17). Además de bacterias, también se han encontrado virus asociados a estas biopelículas del tipo Herpes virus (3, 15).

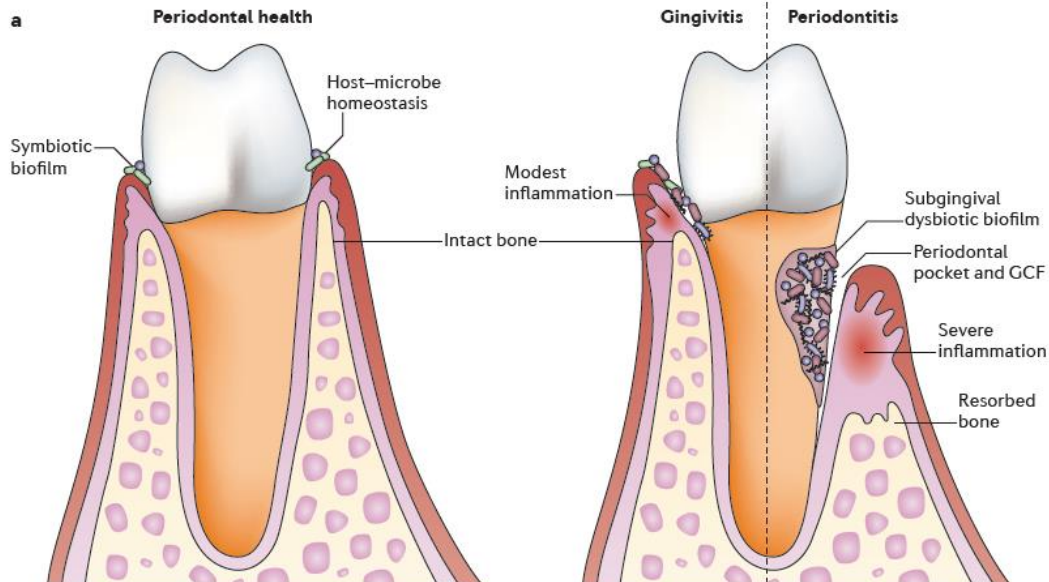


Figura 3 - Representación de la evolución de la enfermedad periodontal. Inicialmente es una inflamación reversible con bacterias patógenas, que posteriormente evoluciona a una periodontitis con una inflamación crónica debido a una disbiosis de la biopelícula, con más patógenos, lo que lleva a la destrucción de tejidos periodontales. Hajishengallis G. 2015. (27).

La principal causa del crecimiento de este tipo de bacterias es la inflamación y rotura de tejido como se ha mencionado anteriormente, generando nutrientes para estas bacterias (4). Unos de los factores de virulencia son las gingipaínas, que son unas proteínas de la familia de las cisteína proteinasas, que degradan fibrinógeno o fibrina llevando a la destrucción de los tejidos y también produce la inhibición de la coagulación, lo que hace que haya más sangrado, permitiendo a *P. gingivalis* obtener hemina (nombre farmacológico para el grupo hemo) que es crítica para su crecimiento (4, 22, 23). Otros factores de virulencia importantes de *P. gingivalis* son el lipopolisacárido (LPS) y las fimbrias o pili, que junto con las gingipaínas, son capaces de activar Toll-like receptors (TLRs) de células de sistema inmune de manera localizada, generando la inflamación que caracteriza a la periodontitis, y dañando el tejido periodontal (22, 23). Además de las bacterias del grupo rojo, también es importante en la patogenia de la periodontitis *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (serotipo b), que es otra bacteria Gram negativa anaerobia, que tiene otros factores de virulencia que ayudan en la progresión de la enfermedad, como por ejemplo, la secreción de exotoxinas, como leucotoxinas o la toxina citoletal distendida (CDT), el LPS u otras enzimas, que terminan destruyendo tejidos y aumentando la inflamación (24–26).

- Estomatitis aftosa recurrente.
Es una enfermedad que afecta a la mucosa oral, y cursa con úlceras orales muy dolorosas. Se ha visto que está relacionado con desequilibrios de la microbiota de la mucosa , sobre todo por la aparición de *Prevotella* y *Rothia* (3).
- Tumor oral.
Algunas bacterias orales como *Streptococcus intermedius*, *S. mitis* y *S. salivarius*, generan productos tóxicos o carcinogénicos a través de su metabolismo, como acetaldehído, que es un carcinogénico reconocido, así como moléculas proinflamatorias que regulan la expresión de citoquinas, afectando a la señalización celular induciendo daño en el DNA, proliferación, angiogénesis, inhibición de la apoptosis, y otros procesos que llevan a la aparición de cáncer (3, 18).

1.5 Tratamientos antibacterianos.

Para evitar que se produzcan estas enfermedades, se tiene que mantener un control de la placa o biopelícula que se forma. Para ello, existen varios métodos de control que pueden reducir la formación de la placa, sobre todo, se ha visto que reducen la concentración de las bacterias patogénicas del grupo rojo de la **Figura 2** (3, 17). Estos métodos se dividen en dos, el control mecánico y el control químico (3, 28–30):

- Control mecánico: a este grupo pertenecen las limpiezas dentales profesionales y el cepillado de dientes individual, que se ha visto que puede reducir la placa dental significativamente, si se mantiene una rutina (28–33). Y también, aunque en menor medida, la limpieza con cepillos interproximales que intentan eliminar la placa que se encuentra entre las encías y los dientes (29, 32).
- Control químico: principalmente sirve como apoyo al control mecánico (33). Dentro de este grupo encontramos las pastas de dientes con flúor (28–30), que además de reducir la placa, también evita la desmineralización del diente en las caries (28), o aquellas que contienen triclosán que es un agente antibacteriano y fungicida, pero que solo puede ser usado en pequeñas dosis debido a sus efectos perjudiciales (30, 32–34). Y también se utilizan colutorios de clorhexidina, que es un antiséptico que se ha visto que reduce la placa dental (28, 30, 33, 34), o con aceites esenciales (30, 33–35). En casos muy severos no agresivos, se pueden utilizar antibióticos, ya sean sistémicos o locales, como amoxicilina o metronidazol.

Sin embargo, las biopelículas tienen la capacidad de resistir a estos antibióticos y al sistema inmune del huésped. Esto es debido a varios factores, entre otros a la presencia de la matriz de exopolisacáridos que actúa como barrera física evitando el infiltrado de elementos del sistema de defensa y también de los antibióticos. También se ha visto que la falta de oxígeno en las zonas más profundas de la biopelícula madura hace que la proliferación sea menor y por tanto menor el efecto de los antibióticos sobre esa población (36–38). Además, existen bacterias de la biopelícula que producen β -lactamasas, que es una enzima que hidroliza el anillo β -lactámico de los antibióticos derivados de la penicilina inactivándolos (4, 38). Otro de estos antibióticos es que son de amplio espectro y pueden llegar a generar resistencias antimicrobianas de otras bacterias (3, 39), ya que no son tan efectivos contra las biopelículas, es decir, se requiere una mayor concentración de antibiótico para ejercer un efecto similar al que se produce cuando no se forma una biopelícula (36).

1.6 Implantología y nuevas opciones de tratamiento.

Si no se realiza la prevención mediante los métodos anteriores, se producen las enfermedades orales inflamatorias, y si continúan sin un tratamiento eficaz, se llega a una enfermedad inflamatoria crónica, que conllevaría la pérdida de dientes, lo que llevará a la necesidad de reponer los dientes perdidos. Hoy en día los implantes dentales representan una opción de tratamiento predecible a largo plazo para la reposición de dientes perdidos (40, 41). La principal causa de pérdida de los implantes a medio-largo plazo es una lesión inflamatoria de los tejidos de soporte peri-implantarios, que recibe el nombre de peri-implantitis (30, 33, 42–44). Tanto la enfermedad periodontal como la peri-implantitis comparten factores de riesgo comunes, siendo uno de los principales el control inadecuado de la placa alrededor de las superficies duras, ya que se sigue formando biopelícula sobre el material del implante por su forma enroscada y su rugosidad, visualizado en la **Figura 4**, a través de los grupos cargados de su superficie o de manera indirecta por las moléculas de la saliva (33, 34, 42, 45). Este control inadecuado se da porque hay veces que existen zonas del implante que no son accesibles por los métodos convencionales de tratamiento mecánico y químico, lo que lleva a la búsqueda de nuevos métodos de prevención de formación de placa (30, 34, 43).

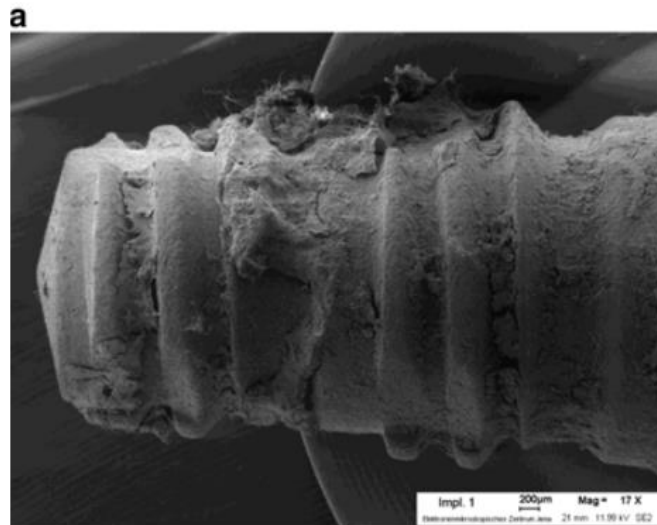


Figura 4 - Imagen de un implante dental recubierto con una biopelícula que produce una peri-implantitis obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Arweiler NB, Netuschil L. 2016. (46).

Algunos de los nuevos métodos que se estudian son:

- Fotofuncionalización mediada por ultravioleta (UV): la radiación ultravioleta produce cambios en la superficie del titanio, pasando de un estado hidrofílico a uno hidrofóbico, que principalmente sirve para aumentar la capacidad osteointegradora del titanio. Pero después se ha estudiado su efecto antimicrobiano. comprobándose que no sólo reduce significativamente la adherencia bacteriana inicial al titanio a corto plazo, sino también la formación de la biopelícula a largo plazo (42).
- Recubrimientos de agentes químicos antimicrobianos: consiste en recubrir los implantes previamente con sustancias antimicrobianas que impidan la adhesión de las bacterias y la formación de la biopelícula. Hay varias opciones de agentes químicos utilizados:
 - Silanos.
Se unen covalentemente a la superficie de titanio y sirven de anclaje también para otras proteínas y péptidos que tienen propiedades antimicrobianas o, todo lo contrario, proteínas que permiten la proliferación bacteriana. El principal silano que se usa con efecto antimicrobiano es el anhídrido trietoxisililpropil succínico (TESPSA) silano, además de ser osteoinductivo (43, 47). Su efecto antibacteriano, es seguro ya que no genera toxicidad en las células humanas, a diferencia de otros

compuestos químicos como el hipoclorito sódico o peróxido de hidrógeno sí que son tóxicos (43).

- Plata.

La plata y compuestos basados en plata tienen un gran efecto antimicrobiano, ya que producen daño en el ácido desoxirribonucleico (DNA) de las bacterias, ya sean Gram positivas o Gram negativas, es decir, tiene un amplio espectro de actuación. Además, la plata es menos tóxica para las células humanas que otros metales (48). Hay distintas formas de añadir la plata a la superficie de titanio, como electrodeposición, implantación de iones, deposición física de vapor (PVD), pulverización catódica de magnetrón, oxidación por micro arco, y nanopartículas (43, 44, 47).

- Nanopartículas.

Las nanopartículas son partículas sólidas con un tamaño menor de 100 nm de diámetro como se muestran en la **Figura 5**, con propiedades únicas que permiten su aplicación en diferentes campos (48, 49). En los últimos tiempos, las nanopartículas han aumentado su fama para servir como potenciales administradores de fármacos o agentes activos. Esto es debido a su pequeño tamaño, seguridad y biocompatibilidad (21, 39), y también por su gran relación área-superficie y su alta densidad de carga, que facilita la interacción con la superficie bacteriana obteniendo un mayor efecto (49). Existen distintos tipos de nanopartículas, están las poliméricas y las metálicas (21, 39). Estos son algunos ejemplos de nanopartículas que se encuentran en estudio:

- Nanopartículas inorgánicas o metálicas: ya se conocía anteriormente la capacidad antimicrobiana de los metales (48), por lo que debido al problema de la resistencia bacteriana, se han desarrollado nanopartículas de cobre, zinc, oro, titanio, selenio, y las más comunes las nanopartículas de plata (48, 49), que como se ha dicho anteriormente, la plata es un gran agente antimicrobiano, y al ensamblarse en nanopartículas, tienen una mayor área de superficie de actuación, por lo que tienen más efecto que un recubrimiento con plata de la superficie (44). El daño lo realizan principalmente al convertir el oxígeno en

especies reactivas de oxígeno debido a su acción catalítica (49, 50). Por otro lado, también se han probado nanopartículas de óxidos metálicos (ZnO, CuO, TiO₂) que también parecen tener efecto antimicrobiano (48).

- Nanopartículas de albúmina: la albúmina sirve como matriz para las nanopartículas, y se usa debido a su biodegradabilidad, lo que permite una liberación gradual del agente antimicrobiano. En este caso, el agente antimicrobiano estudiado es la clorhexidina, aunque se podría unir otros tipos de agentes. El agente puede unirse a la superficie de la nanopartícula ya formada, o también puede estar incorporado en la nanopartícula intercalado con las moléculas de albúmina (51).

- Nanopartículas de quitosano: el quitosano es un polímero natural derivado de la desacetilación de la quitina presente en los exoesqueletos de artrópodos, crustáceos... (48, 52). Es biocompatible y biodegradable, no es tóxico, y además se ha visto que tienen actividad antimicrobiana (48, 49, 52). Por lo que, a partir de una solución de quitosano, se producen estas nanopartículas, y se ha estudiado el efecto que tenían estas nanopartículas en bacterias orales, donde se ha probado que tienen gran actividad antibacteriana contra *Streptococcus*, y que reducen la formación de biopelículas orales. Este efecto se debe a que el quitosano está cargado positivamente, lo que permite una mejor adhesión a la pared celular de las bacterias (52, 53), aumentando la permeabilidad de la membrana, alterando el equilibrio, o también interfiriendo con la síntesis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas (53). Además de su efecto antibacteriano intrínseco, el quitosano también puede servir como portador y liberador de otros agentes antimicrobianos (52, 53).

- Nanopartículas poliméricas bioactivas (PolymP-n Active): estas nanopartículas, presentadas en la **Figura 5**, están compuestas por un monómero principal, el 2-hidroxietil metacrilato, un reticulante, el dimetacrilato de etilenglicol, y un monómero funcional, el ácido metacrílico. Además, tienen grupos carboxilato (COO⁻) que permiten la quelación con iones con capacidad antimicrobiana, como Calcio, Zinc o Plata, u otros agentes antibióticos como la doxiciclina (21,

54–56). Estas nanopartículas solamente se han probado sobre discos de hidroxiapatita, simulando la superficie dental, donde se ha visto que tienen la capacidad de reducir la formación de biopelículas, sobre todo las de plata y doxiciclina. (21). Por ahora no se ha estudiado el efecto que tendrían sobre implantes de titanio, que es uno de los materiales más utilizados en implantes dentales, por ser biocompatible, resistente a la corrosión, y además porque promueve la osteointegración del implante (42, 44, 45, 51).

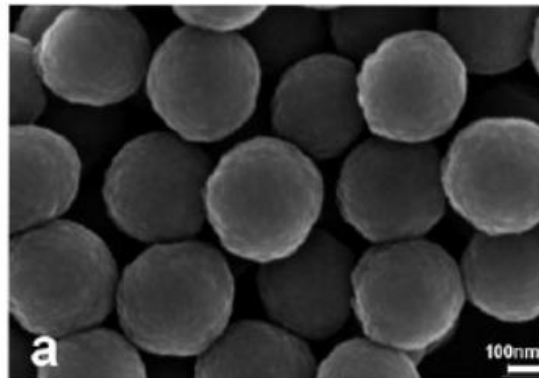


Figura 5 - Imagen de nanopartículas poliméricas PolymP-n Active obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Osorio R, Osorio E, Medina-Castillo AL & Toledano M. 2014. (57).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es estudiar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas poliméricas activas (PolymP-n Active) desnudas o dopadas con doxiciclina, sobre la formación de biopelícula en discos de titanio simulando el implante. Dicho efecto antimicrobiano se estudiará sobre biopelículas formadas por distintas cepas bacterianas.

CAPÍTULO 2. Materiales y métodos.

2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Se usaron las cepas bacterianas de *Streptococcus oralis* CECT 907T, *Veillonella parvula* NCTN 11810, *Actinomyces naeslundii* ATCC 19038, *Fusobacterium nucleatum* DMSZ 20482, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSMZ 8324, y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Las cepas bacterianas se crecieron en placas de agar sangre (Blood Agar Oxoid No. 2; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementadas con 5% (v/v) de sangre de caballo estéril (Oxoid), 5.0 mg/mL de hemina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) y 1.0 mg/mL de menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en condiciones de anaerobiosis (10% H_2 , 10% CO_2 y el resto N_2) en jarras de anaerobiosis con catalizadores de zinc recubiertas de paladio (catalizan la combinación de H_2 y O_2 en H_2O), a 37°C durante 24-72 horas.

2.2 Preparación de nanopartículas.

Se estudiaron dos tipos de nanopartículas (NPs): (a) NP PolymP-n Active desarrolladas y descritas por el grupo de Osorio y colaboradores (54); (b) NPs Active dopadas con doxiciclina. Las nanopartículas utilizadas fueron generadas por el grupo de Investigación de Biomateriales en Odontología de la Universidad de Granada. Tienen un diámetro de 100 nm y se fabricaron mediante un proceso de polimerización-precipitación compuestas por un monómero principal, el 2-hidroxietil metacrilato, un reticulante, el dimetacrilato de etilenglicol, y un monómero funcional, el ácido metacrílico. Para el dopaje con doxiciclina, se añaden 30 mg de NPs en una solución acuosa de 40mg/mL de hidrato de doxiciclina durante 4 horas a temperatura ambiente y con agitación continua (21, 55, 56). Después las NPs se centrifugan en las mismas condiciones anteriores, se desecha el sobrenadante y se resuspenden en tampón salino (PBS). Esto se hace 7 días antes de utilizar las NPs para evitar la liberación de doxiciclina y pérdida de efectividad (21, 56).

2.3 Preparación de los discos de titanio.

Los discos de titanio estériles de 5 mm de diámetro con una superficie SLA grado 2 (Ti-SLA) (arenado, grano grande, grabado con ácido; Straumann; Institut Straumann AG, Basilea, Suiza) se recubrieron mediante microaplicadores dentales microbrush (Akzenta, Suiza), con la solución de NPs previamente resuspendidas, mediante el tratamiento de 1 min en sonicador y 1 min en vórtex, hasta que quedaba una gota visible sobre la superficie. Después se dejaron secar a

temperatura ambiente. Para los controles se usaron discos de titanio recubiertos con PBS mediante los microaplicadores. Todo ello se lleva a cabo en campana de flujo para evitar contaminaciones.

2.4 Formación de la biopelícula.

Muestras de bacterias crecidas previamente en placas de agar sangre, se cogieron con asa de siembra y se añadieron a tubos tipo Falcon separados para cada cepa, con 15 ml de medio líquido BHI-2 (brain-heart infusion medium) y se incubaron durante 24 h en condiciones de anaerobiosis a 37 °C hasta que alcanzaron la fase de crecimiento exponencial (se usó otro tubo Falcon solo con medio BHI-2 como control). El medio BHI-2 es un medio rico en proteínas que contiene extractos de cerebro y corazón (Becton, Dickinson and Company; Becton, Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, EEUU). Ese medio se suplementó 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 sódico (Merck), 5,0 mg/L de hemina (Sigma), 1,0 mg/L de menadiona (Merck), y 0,25 % (v/v) de ácido glutámico (Sigma).

Después de la incubación se midió la densidad óptica (DO) a 550 nm en el espectrofotómetro y se ajustó la concentración de células para obtener 10^3 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) para *Streptococcus oralis*, 10^5 UFC/mL para *Veillonella parvula* y *Actinomyces naeslundii*, y 10^6 UFC/mL para *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* como describieron previamente Sánchez y colaboradores (11) a un volumen final de 1,5 mL por pocillo. Se añadió el volumen correspondiente de cada cepa a un tubo Falcon con medio BHI-2 hasta el volumen final total para todos los pocillos a realizar, obteniendo una mezcla de todas las cepas.

Por último, se colocaron los discos de titanio en los pocillos de placas de 24 pocillos y se añadió 1,5 mL de la mezcla de cepas bacterianas en cada pocillo, como se muestra en la **Figura 6**. Además, se usaron pocillos solo con la mezcla de las cepas bacterianas como control positivo de la formación de la biopelícula, y otros solo con medio BHI-2 como control de contaminación. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 12, 24, 48 y 72 horas.

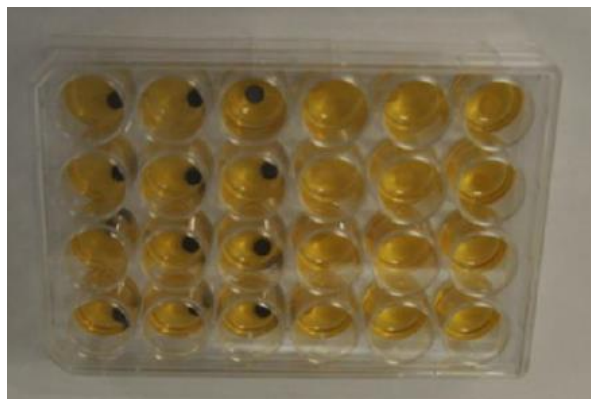


Figura 6 - Discos de titanio en placas de 24 pocillos inoculados con la mezcla de las cepas bacterianas.

2.5 Evaluación de biomasa de la biopelícula.

Tras las horas de incubación correspondientes, se extrajeron los discos con biopelícula con pinzas flameadas con mucho cuidado de no tocar la superficie y eliminar la biopelícula, y se introdujeron en tubos eppendorf con 1 mL de PBS. Después se pusieron los tubos tipo eppendorf 2 minutos en vórtex para desprender las bacterias de la biopelícula al medio. Posteriormente se retiraron los discos de titanio con pinzas previamente flameadas. Se centrifugaron los eppendorf a 13000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente, y se desechó el sobrenadante. A continuación, se procedió a la extracción del ADN mediante un kit comercial (MolYsis Complete5; Molzym GmgH & CoKG, Bremen, Germany) siguiendo los pasos de las instrucciones.

Para cuantificar la cantidad de ADN de cada población bacteriana, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) de ensayo de sondas de hidrolisis de 5' nucleasa (sondas TaqMan) con un protocolo optimizado previamente por el grupo de investigación de Sánchez y colaboradores (58). La amplificación se realizó en un volumen total de mezcla de reacción de 10 μ L. Las mezclas de reacción contenían 5 μ L de mezcla 2x master (LC 480 Probes Master; Roche), concentraciones óptimas de cebadores y sonda (900, 900 y 300 nM para *S. oralis*; 300, 300 y 300 nM para *A. naeslundii*; 750, 750 y 400 nM para *V. parvula*; 300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 y 300 nM para *P. gingivalis*; y 600, 600 y 300 nM para *F. nucleatum*), y 2 μ L de agua estéril [sin control de plantilla (NTC), grado de PCR de agua, Roche]. Las sondas y cebadores fueron sintetizados por Life Technologies Applied Biosystems (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los cebadores utilizados estaban dirigidos para amplificar el gen ARNr 16S de cada especie bacteriana y se muestran en la **Tabla 1**. Las condiciones de qPCR fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 95

°C durante 15 s, y 60 °C durante 1 min. Los análisis se realizaron con un termociclador LightCycler®480 II (Roche). Las placas utilizadas fueron FramStar 480 de marco natural y pozos blancos (4titude; The North Barn; Damphurst Lane, Reino Unido), selladas por qPCR Adhesive Clear Seals (4titude). Cada muestra de ADN se analizó por duplicado. El ciclo de cuantificación (Cq) se determinó utilizando el paquete de software proporcionado (LC 480 Software 1.5; Roche). La cuantificación de las células por qPCR se basó en curvas estándar. La correlación entre los valores de Cq y Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se generó automáticamente a través del software.

Tabla 1 - Cebadores y sondas usadas para la cuantificación de biomasa bacteriana a través de qPCR. Los cebadores y sondas están dirigidos al gen ARNr 16S de cada especie.

Bacteria	Secuencia (5'-3')
<i>Streptococcus oralis</i>	
Sonda	6FAM-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA—BBQ
Cebador forward	CAACGATACATAGCCGACCTGAG
Cebador reverso	TCCATTGCCGAAGATTCC
<i>Actinomyces naeslundii</i>	
Sonda	6FAM-CCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT--BBQ
Cebador forward	GGCTGCGATACCGTGAGG
Cebador reverso	TCTGCGATTACTAGCGACTCC
<i>Veillonella parvula</i>	
Sonda	6FAM-CTATCCTCGATGCCGA—BBQ
Cebador forward	TGCTAATAACCGCATACGATCTAACC
Cebador reverso	GCTTATAAATAGAGGCCACCTTTCA
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
Sonda	6FAM-CTCTACACTTGTAGTTCCG-TAMRA
Cebador forward	GGATTTATTGGGCGTAAAGC
Cebador reverso	GGCATTCTACAAATATCTACGAA
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	
Sonda	6FAM-AGAACTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA
Cebador forward	GAACCTTACCTACTCTTGACATCCGAA
Cebador reverso	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
Sonda	6FAM-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA
Cebador forward	GCGCTCAACGTTTCAGCC
Cebador reverso	CACGAATTCCGCCTGC

2.6 Análisis estadístico

Para comparar el efecto de las nanopartículas sobre las unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, se usó un análisis de varianza y un test de post.-h de ANOVA T3 de Dunnett. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p < 0,05$. Se utilizó un paquete de software (IBM SPSS Statistics 22.0; IBM Corporation, Armonk, NY, EUA) para todos los análisis de datos.

CAPÍTULO 3. Resultados.

Con el objetivo de estudiar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas poliméricas activas (PolymP-n Active) desnudas o dopadas con doxiciclina sobre la formación de biopelículas en implantes de titanio, se estudió el crecimiento de distintas especies de bacterias adheridas a discos de titanio que simulan el implante. Para ello se eligieron especies bacterianas que son características de la microbiota oral en las distintas fases de formación de las biopelículas. Como colonizadores primarios se utilizaron *Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*, como colonizador temprano se usó *Veillonella parvula*, como secundario *Fusobacterium nucleatum* y, por último, los colonizadores tardíos utilizados fueron *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*.

En la **Figura 7**, están representados los UFC/mL de cada especie bacteriana para cada tipo de tratamiento. En todas las cepas bacterianas en condiciones control se sigue una tendencia de aumento en el número de UFCs a medida que avanza el tiempo de incubación, excepto para *A. actinomycetemcomitans* que tiene gran variabilidad sin ningún patrón aparente. En el caso de la determinación del número de bacterias crecidas en biopelículas sobre discos dopados con nanopartículas Active no hay diferencias importantes con el control, observándose únicamente un aumento significativo en *S. oralis* a las 72 h, y una disminución en *F. nucleatum* y en *A. actinomycetemcomitans* las 72 h. Sin embargo, en los casos en los que las nanopartículas fueron dopadas con doxiciclina se observó una clara reducción en el número de bacterias crecidas en biopelículas en las especies *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* tras las 72 h de incubación. Por otro lado, la reducción en el número de bacterias se empieza a apreciar a partir de las 24 h de incubación para las especies *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, y a partir de las 12 h para *S. oralis*. Por último, la única especie bacteriana que no demostró ningún cambio significativo fue *P. gingivalis*, que corresponde con un colonizador tardío.

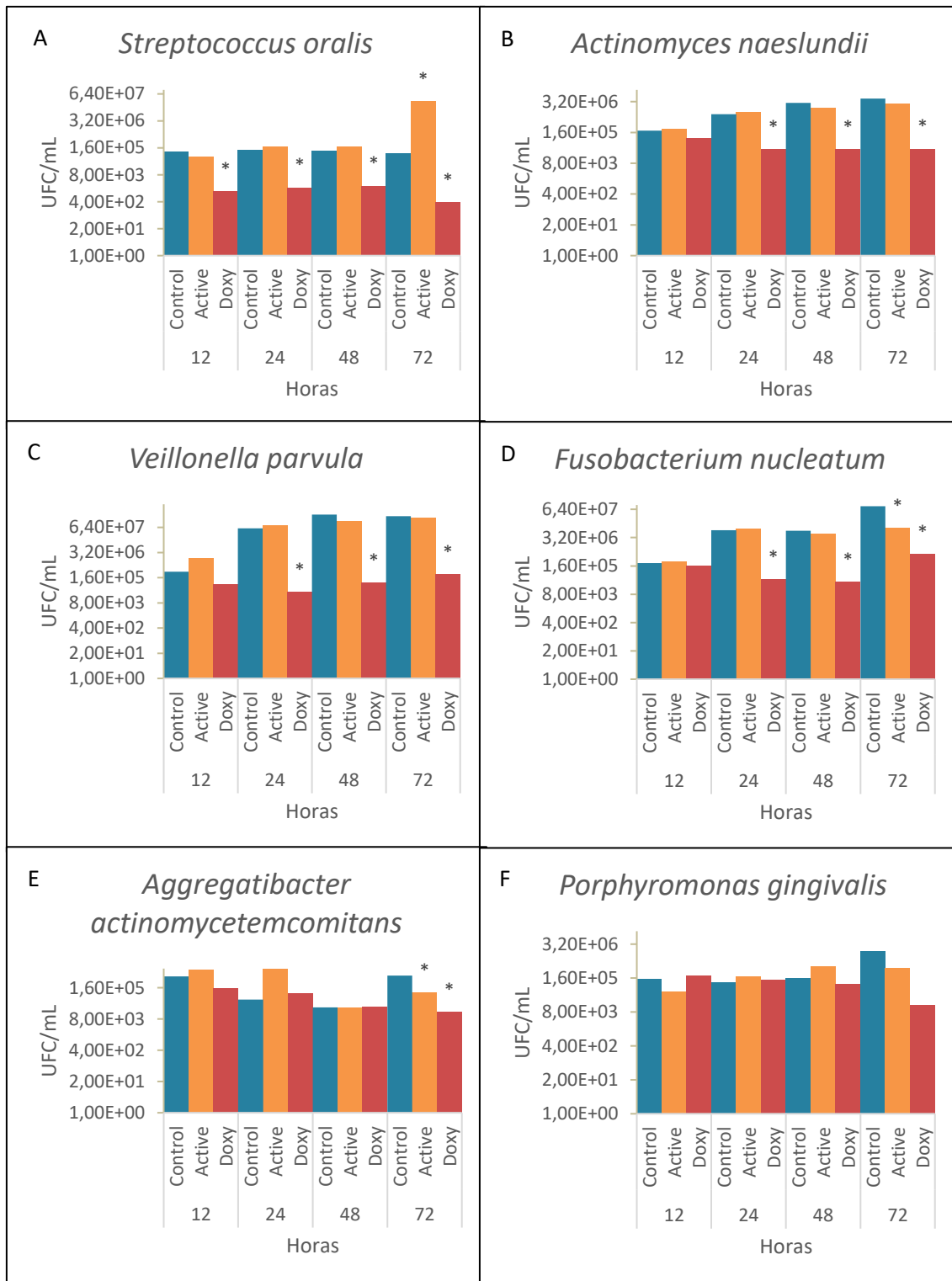


Figura 7 - Número de bacterias crecidas en biopelículas in vitro a diferentes tiempos de incubación sobre discos de titanio dopados con tampón fosfato salino (PBS) como control, y con dos tipos de nanopartículas (NPs): NPs Active y NPs Active dopadas con doxiciclina (Doxy), para cada cepa bacteriana. Cepas colocadas en orden de colonización A) y B) primarios, C) temprano D) secundario E) y F) tardíos. (N=3 para cada tiempo de incubación). * Diferencias significativas comparado con el control ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 4. Discusión.

Los resultados obtenidos sugieren que las nanopartículas Active dopadas con doxiciclina tienen un gran potencial terapéutico para la peri-implantitis, disminuyendo el crecimiento bacteriano, sobre todo de las especies que son consideradas colonizadores primarios, *S. oralis*, *A. naeslundii*, y tempranos, *V. parvula*, e incluso los colonizadores secundarios *F. nucleatum*, donde se empiezan a ver los efectos generalmente a partir de las 24 horas de incubación. Esto sugiere que las nanopartículas están actuando como un enlace entre la superficie de titanio y las bacterias, que además de actuar como un antibacteriano, actúa rompiendo la estructura de la biopelícula desde la base (21, 59). Estos resultados coinciden con lo descrito previamente por Sánchez et al. (21), utilizando el mismo tipo de nanopartículas sobre discos de hidroxiapatita, pero el efecto fue el mismo, donde aquellos discos con las nanopartículas Active-Doxiciclina manifestaron una reducción significativa en el número de bacterias comparado con el control, para todas las especies. La razón por la que las nanopartículas no tienen tanto efecto en los colonizadores tardíos como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* es debido a las nanopartículas se encuentran en la base de la biopelícula, y su efecto no es capaz de alcanzar las últimas capas donde se encuentran estos colonizadores tardíos o patógenos (21), aunque sí que se ha visto que la doxiciclina tienen efectos antibacterianos sobre estos patógenos cuando se encuentran en forma libre, no en biopelículas (56, 59, 60).

En cuanto a los resultados de las nanopartículas Active, se ve que en *S. oralis* aumenta el número de bacterias con respecto al control. Esto puede ser debido a que las nanopartículas proporcionan un aumento en la rugosidad de la superficie, lo que facilita la adhesión de las bacterias iniciales o colonizadores primarios, a los que pertenece *S. oralis* (21, 61). Curiosamente, se ha visto que las nanopartículas Active han tenido un efecto sobre las especies *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*, reduciendo el número de bacterias a las 72 horas de incubación. No se sabe por qué se da este efecto, y para poder averiguarlo, es necesario realizar otros estudios adicionales.

Además, otro problema que presentó *A. actinomycetemcomitans* es la gran variabilidad que demostraron los datos, sobre todo la falta de evolución en el crecimiento de la biopelícula a lo largo del tiempo en los grupos control. Esto sugiere que ha habido un crecimiento incorrecto de esta especie bacteriana durante la formación de la biopelícula. Esto puede ser debido a los problemas que se tuvo a la hora de cultivarla en placa, ya que por alguna razón desconocida no

conseguía crecer de manera adecuada. Por lo tanto, se debería repetir este experimento cuando se solucione el problema de base.

Una vez visto el efecto de las nanopartículas sobre el número de bacterias, sería interesante estudiar el efecto sobre la viabilidad de las bacterias. Esto se podría determinar mediante microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) mediante el método de tinción de muestras con la solución LIVE / DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes B. V., Leiden, Países Bajos) a temperatura ambiente, con una relación de fluorocromos 1: 1 y 9 ± 1 min de tiempo de tinción para obtener la señal de fluorescencia óptima a las longitudes de onda correspondientes (Syto9: 515–530 nm; PI:> 600 nm). Esto permite distinguir la cantidad de bacteria vivas mediante un color verde y muertas con color rojo. Esta técnica se ha realizado en un estudio anterior de Sánchez y colaboradores (21), en el que en la zona de la biopelícula más cercana a las nanopartículas, principalmente en las nanopartículas Active dopadas con doxiciclina, detectaron un mayor porcentaje de células muertas, como resultado de la acción antibiótica del compuesto (21).

El siguiente aspecto por considerar es la falta de estudios *in vivo* de este tipo de terapias, donde se vea realmente el efecto y seguridad, además de la biocompatibilidad de las nanopartículas. Es posible que las nanopartículas tengan cierta toxicidad con respecto a las células del organismo, ya sea alrededor del implante, como los osteoblastos, o incluso puede llegar a acumularse en otros tejidos u órganos debido a su pequeño tamaño que facilita su transporte, lo que las hace más tóxicas (49, 62). Sin embargo, se ha comprobado que la actividad antimicrobiana también es inversamente proporcional al tamaño de las nanopartículas, siendo las más pequeñas las que mayor efecto tienen (48), por lo que habría que encontrar un tamaño de nanopartícula que mantenga un equilibrio entre la toxicidad y efectividad deseadas. Pero además, se ha visto que la toxicidad puede depender también de otros factores, como pueden ser el tiempo de exposición, la concentración, distribución, tamaño... (49, 63), que se deben de tener en cuenta a la hora de sintetizar las mejores nanopartículas.

CAPÍTULO 5. Conclusión.

El estudio realizado *in vitro* muestra que el recubrimiento de los implantes de titanio mediante nanopartículas poliméricas Active no produce ningún efecto antibacteriano, comportándose como control. Sin embargo, las nanopartículas PolymP-n Active dopadas con doxiciclina, produce la reducción del número de las bacterias que inician la formación de las biopelículas, es decir, los colonizadores primarios y tempranos, lo que lleva a la formación de una biopelícula más débil, que acabará despegándose de la superficie del implante con mayor facilidad.

CAPÍTULO 6. Bibliografía.

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016 Aug 19;14(8).
2. Pozhitkov AE, Beikler T, Flemmig T, Noble PA. High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. *Periodontol 2000.* 2011 Feb;55(1):70–86.
3. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. Vol. 99, *Biomedicine and Pharmacotherapy.* Elsevier Masson SAS; 2018. p. 883–93.
4. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: Communities, conflict and control. *Periodontol 2000.* 2011 Feb;55(1):16–35.
5. Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000.* 2006 Oct;42(1):7–12.
6. Palmer RJ. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol 2000.* 2014 Feb;64(1):20–39.
7. Microbiol IS-PJ, 2014 U. The Oral Microbiome in Dental Caries. *researchgate.net.* 2014.
8. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 Oct 1;192(19):5002–17.
9. Diaz PI, Valm AM. Microbial Interactions in Oral Communities Mediate Emergent Biofilm Properties. *J Dent Res.* 2020 Jan 7;99(1):18–25.
10. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014 Dec 1;162(2):22–38.
11. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res.* 2011 Apr 1;46(2):252–60.
12. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. Vol. 200, *Archives of Microbiology.* Springer Verlag; 2018. p. 525–40.
13. Shao H, Demuth DR. Quorum sensing regulation of biofilm growth and gene expression by oral bacteria and periodontal pathogens. *Periodontol 2000.* 2010 Feb;52(1):53–67.
14. Escudero-Castaño N, Perea-García MA, Bascones-Martínez A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Av en Periodoncia e Implamol Oral.* 2008;20(1):27–37.
15. Colombo AP V, Tanner ACR. The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective. *J Dent Res.* 2019 Apr

- 19;98(4):373–85.
16. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134–44.
 17. Belstrøm D, Grande MA, Sembler-Møller ML, Kirkby N, Cotton SL, Paster BJ, et al. Influence of periodontal treatment on subgingival and salivary microbiotas. *J Periodontol.* 2018 May 1;89(5):531–9.
 18. Willis JR, Gabaldón T. The human oral microbiome in health and disease: From sequences to ecosystems. Vol. 8, *Microorganisms*. MDPI AG; 2020.
 19. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Vol. 38, *Periodontology 2000*. 2005. p. 135–87.
 20. Espinoza JL, Harkins DM, Torralba M, Gomez A, Highlander SK, Jones MB, et al. Supragingival plaque microbiome ecology and functional potential in the context of health and disease. *MBio.* 2018 Nov 1;9(6).
 21. Sánchez MC, Toledano-Osorio M, Bueno J, Figuero E, Toledano M, Medina-Castillo AL, et al. Antibacterial effects of polymeric PolymP-n Active nanoparticles. An in vitro biofilm study. *Dent Mater.* 2019 Jan 1;35(1):156–68.
 22. Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2020 Jan 1;120:45–84.
 23. Jia L, Han N, Du J, Guo L, Luo Z, Liu Y. Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. Vol. 9, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
 24. Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V, Kafil HS. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Vol. 113, *Microbial Pathogenesis*. Academic Press; 2017. p. 303–11.
 25. Belibasakis, Maula, Bao, Lindholm, Bostanci, Oscarsson, et al. Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens.* 2019 Nov 6;8(4):222.
 26. Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol Oral Microbiol.* 2016 Jun 1;31(3):207–27.
 27. Hajishengallis G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 30–44.

28. Figuro E, Nóbrega DF, García-Gargallo M, Tenuta LMA, Herrera D, Carvalho JC. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar 1;44:S116–34.
29. Chapple ILC, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr 1;42(S16):S71–6.
30. Salvi GE, Ramseier CA. Efficacy of patient-administered mechanical and/or chemical plaque control protocols in the management of peri-implant mucositis. A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr 1;42(S16):S187–201.
31. Needleman I, Suvan J, Moles DR, Pimlott J. A systematic review of professional mechanical plaque removal for prevention of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct;32(s6):229–82.
32. van der Weijden GA, Hioe KPK. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct;32(s6):214–28.
33. Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Mar 1;21(8):866–72.
34. Charalampakis G, Ramberg P, Dahlén G, Berglundh T, Abrahamsson I. Effect of cleansing of biofilm formed on titanium discs. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Aug 1;26(8):931–6.
35. Sánchez MC, Fernández E, Llama-Palacios A, Figuro E, Herrera D, Sanz M. Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. *Dent Mater*. 2017 Apr 1;33(4):446–53.
36. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Oct 1;22(5):333–9.
37. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Vol. 35, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier; 2010. p. 322–32.
38. Joseph HA, Swamy SS, Solomon AP. Antibiotic Resistance in Biofilms. In: *ACS Symposium Series*. American Chemical Society; 2019. p. 205–24.
39. Mahmoud MY, Steinbach-Rankins JM, Demuth DR. Functional assessment of peptide-modified PLGA nanoparticles against oral biofilms in a murine model of periodontitis. *J Control Release*. 2019 Mar 10;297:3–13.

40. Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. Vol. 72, *Journal of Hospital Infection*. W.B. Saunders; 2009. p. 104–10.
41. Guillaume B. Les implants dentaires : revue. Vol. 100, *Morphologie*. Elsevier Masson SAS; 2016. p. 189–98.
42. de Avila ED, Lima BP, Sekiya T, Torii Y, Ogawa T, Shi W, et al. Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material. *Biomaterials*. 2015 Oct 1;67:84–92.
43. Godoy-Gallardo M, Manzanares-Céspedes MC, Sevilla P, Nart J, Manzanares N, Manero JM, et al. Evaluation of bone loss in antibacterial coated dental implants: An experimental study in dogs. *Mater Sci Eng C*. 2016 Dec 1;69:538–45.
44. Juan L, Zhimin Z, Anchun M, Lei L, Jingchao Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *Int J Nanomedicine*. 2010;5(1):261–7.
45. Souza JGS, Cordeiro JM, Lima C V., Barão VAR. Citric acid reduces oral biofilm and influences the electrochemical behavior of titanium: An in situ and in vitro study. *J Periodontol*. 2019 Feb 1;90(2):149–58.
46. Arweiler NB, Netuschil L. The oral microbiota. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2016. p. 45–60.
47. Vilarrasa J, Delgado LM, Galofré M, Àlvarez G, Violant D, Manero JM, et al. In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm over antibacterial coated titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Nov 1;29(11):1–10.
48. Allaker RP, Memarzadeh K. Nanoparticles and the control of oral infections. Vol. 43, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.; 2014. p. 95–104.
49. Song W, Ge S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules*. 2019 Mar 15;24(6):1033.
50. Xu H, Qu F, Xu H, Lai W, Wang YA, Aguilar ZP, et al. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli O157:H7. *BioMetals*. 2012 Feb;25(1):45–53.
51. Da HK, Kyo-Han K, Tae-Yub K, Seok HC, Seong SK, Soon-Taek K, et al. Antibacterial releasing titanium surface using albumin nanoparticle carriers. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014 Nov 1;14(11):8422–6.
52. Aliasghari A, Khorasgani MR, Vaezifar S, Rahimi F, Younesi H, Khoroushi M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: An in vitro study. *Iran J Microbiol*. 2016;8(2):93–100.

53. Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res*. 2017 Jul 1;8(4):387–92.
54. Osorio R, Alfonso-Rodríguez CA, Medina-Castillo AL, Alaminos M, Toledano M. Bioactive polymeric nanoparticles for periodontal therapy. *PLoS One*. 2016 Nov 1;11(11).
55. Toledano M, Osorio E, Aguilera FS, Muñoz-Soto E, Toledano-Osorio M, López-López MT, et al. Polymeric nanoparticles for endodontic therapy. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020 Mar 1;103:103606.
56. Toledano-Osorio M, Babu J, Osorio R, Medina-Castillo A, García-Godoy F, Toledano M. Modified Polymeric Nanoparticles Exert In Vitro Antimicrobial Activity Against Oral Bacteria. *Materials (Basel)*. 2018 Jun 14;11(6):1013.
57. Osorio R, Osorio E, Medina-Castillo AL, Toledano M. Polymer nanocarriers for dentin adhesion. *J Dent Res*. 2014 Dec 25;93(12):1258–63.
58. Sánchez MC, Marín MJ, Figuero E, Llama-Palacios A, León R, Blanc V, et al. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res*. 2014 Feb 1;49(1):20–8.
59. Kim T-S, Bürklin T, Schacher B, Ratka-Krüger P, Schaecken MT, Renggli HH, et al. Pharmacokinetic Profile of a Locally Administered Doxycycline Gel in Crevicular Fluid, Blood, and Saliva. *J Periodontol*. 2002 Nov 1;73(11):1285–91.
60. Larsen T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol Immunol*. 2002 Oct 1;17(5):267–71.
61. Ionescu AC, Hahnel S, Cazzaniga G, Ottobelli M, Roberto •, Braga R, et al. *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation on experimental composites containing dicalcium phosphate dihydrate nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med*. 2017;28:108.
62. Ali SA, Rizk MZ, Hamed MA, Aboul-Ela EI, El-Rigal NS, Aly HF, et al. Assessment of titanium dioxide nanoparticles toxicity via oral exposure in mice: effect of dose and particle size. *Biomarkers*. 2019 Jul 4;24(5):492–8.
63. Dutra-Correa M, Leite AABV, de Cara SPHM, Diniz IMA, Marques MM, Suffredini IB, et al. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. *J Dent*. 2018 Oct 1;77:66–71.

APÉNDICES.

Tabla suplementaria 1 - Número de bacterias (Medias + desviación estándar) de *S. oralis* (So), *A. naeslundii* (An), *V. parvula* (Vp), *F. nucleatum* (Fn), *A. actinomycetemcomitans* (Aa) y *P. gingivalis* (Pg) crecidas en una biopelícula in vitro a diferentes tiempos de incubación, medidas por qPCR, sobre discos de titanio dopados con tampón fosfato salino (PBS) como control, y con dos tipos de nanopartículas (NPs): NPs Active y NPs Active dopadas con doxiciclina (N=3 para cada tiempo de incubación).

Bacteria	Tiempo de incubación (h)	Control	NPs Active	NPs Active + Doxiciclina
So	12	1,06E+05 (1,16E+05)	5,81E+04 (7,87E+04)	1,25E+03 (6,58E+02)
	24	1,26E+05 (4,17E+04)	1,89E+05 (1,28E+05)	1,94E+03 (1,54E+03)
	48	1,10E+05 (6,38E+04)	1,83E+05 (8,83E+04)	2,31E+03 (1,32E+03)
	72	8,81E+04 (6,68E+04)	2,75E+07 (1,04E+07)	3,78E+02 (1,48E+02)
An	12	1,88E+05 (5,00E+04)	2,26E+05 (4,29E+04)	9,38E+04 (9,02E+04)
	24	9,34E+05 (3,38E+05)	1,15E+06 (6,90E+05)	3,15E+04 (9,21E+03)
	48	2,80E+06 (1,35E+06)	1,76E+06 (5,61E+05)	3,15E+04 (1,50E+04)
	72	4,25E+06 (1,58E+06)	2,70E+06 (1,89E+06)	3,20E+04 (3,96E+03)
Vp	12	3,26E+05 (1,28E+05)	1,54E+06 (1,94E+06)	7,20E+04 (1,08E+05)
	24	5,79E+07 (8,34E+07)	8,31E+07 (9,94E+07)	2,86E+04 (2,06E+04)
	48	2,93E+08 (3,57E+08)	1,31E+08 (6,75E+07)	8,82E+04 (6,93E+04)
	72	2,40E+08 (1,18E+08)	1,96E+08 (1,39E+08)	2,48E+05 (1,27E+05)
Fn	12	2,16E+05 (1,49E+05)	2,51E+05 (1,12E+05)	1,58E+05 (1,82E+05)
	24	6,99E+06 (1,96E+06)	8,32E+06 (6,31E+06)	3,90E+04 (2,97E+04)
	48	6,62E+06 (7,44E+06)	4,67E+06 (3,99E+06)	3,04E+04 (2,17E+04)

Aa	72	8,78E+07 (2,84E+07)	9,06E+06 (5,08E+06)	5,40E+05 (4,38E+04)
	12	4,77E+05 (3,42E+05)	8,61E+05 (3,17E+04)	1,45E+05 (1,70E+05)
	24	5,14E+04 (2,96E+04)	9,88E+05 (1,61E+06)	9,35E+04 (1,30E+05)
	48	2,45E+04 (5,42E+03)	2,31E+04 (7,21E+03)	2,58E+04 (8,15E+03)
	72	5,07E+05 (1,96E+05)	9,80E+04 (3,48E+04)	1,56E+04 (6,36E+03)
Pg	12	1,43E+05 (1,37E+05)	4,78E+04 (1,73E+04)	2,04E+05 (1,58E+05)
	24	1,13E+05 (9,71E+03)	1,88E+05 (3,18E+04)	1,36E+05 (4,40E+04)
	48	1,63E+05 (2,08E+05)	4,53E+05 (2,52E+05)	9,67E+04 (3,38E+04)
	72	1,74E+06 (2,74E+06)	3,82E+05 (1,72E+05)	1,48E+04 (5,12E+03)

Tabla suplementaria 2 - Test post hoc de ANOVA T3 de Dunnett (N=3 para cada tiempo de incubación)

Bacteria	Tiempo	Tratamiento		Intervalo de confianza al 95%					
				Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Límite inferior	Límite superior	
So	12h	Control	Active	0,89612	1,03525	0,777	-3,1181	4,9104	
			Doxy	4,11807*	0,68978	0,026	0,9091	7,3270	
	24h	Control	Active	-0,29791	0,40130	0,840	-2,1020	1,5062	
			Doxy	4,44767*	0,63368	0,028	1,0294	7,8660	
	48h	Control	Active	-0,53121	0,40546	0,538	-2,0667	1,0043	
			Doxy	3,87606*	0,45147	0,003	2,1813	5,5709	
	72h	Control	Active	-6,10795*	0,81828	0,022	-10,4097	-1,8062	
			Doxy	5,09303*	0,82328	0,033	0,8458	9,3403	
	An	12h	Control	Active	-0,20023	0,20504	0,719	-1,0238	0,6234
				Doxy	0,98125	0,58096	0,424	-2,1200	4,0825
		24h	Control	Active	-0,15186	0,40421	0,972	-1,7328	1,4291
				Doxy	3,36294*	0,28778	0,002	2,2017	4,5242
48h		Control	Active	0,42735	0,31038	0,512	-0,8181	1,6728	
			Doxy	4,48767*	0,36810	0,001	3,1089	5,8664	
72h		Control	Active	0,56195	0,43307	0,559	-1,3300	2,4538	
			Doxy	4,85163*	0,21608	0,001	3,7331	5,9702	
Vp		12h	Control	Active	-0,99495	0,82827	0,618	-5,3419	3,3521
				Doxy	2,46835	1,04411	0,262	-3,3773	8,3140
		24h	Control	Active	-0,64616	1,34924	0,946	-5,7394	4,4471
				Doxy	6,99249*	1,21270	0,017	2,0821	11,9029
	48h	Control	Active	0,35569	0,83032	0,959	-3,4475	4,1589	
			Doxy	8,07853*	1,17330	0,007	3,6117	12,5454	
	72h	Control	Active	0,35139	0,56599	0,894	-2,1531	2,8559	
			Doxy	6,88928*	0,39527	0,000	5,3968	8,3817	
	Fn	12h	Control	Active	-0,30194	0,61643	0,942	-2,9317	2,3278
				Doxy	0,57029	0,89018	0,886	-2,8909	4,0315
		24h	Control	Active	-0,02396	0,43248	1,000	-2,1542	2,1063
				Doxy	5,59260*	0,80209	0,035	0,9115	10,2737
48h		Control	Active	0,14565	0,78506	0,996	-2,9481	3,2394	
			Doxy	5,14995*	0,78601	0,010	2,0556	8,2443	
72h		Control	Active	2,34599*	0,39361	0,019	0,6686	4,0233	
			Doxy	5,05538*	0,20064	0,002	3,9168	6,1940	
Aa		12h	Control	Active	-0,93970	0,69444	0,565	-5,3337	3,4543
				Doxy	1,31754	0,96376	0,509	-2,2938	4,9289
		24h	Control	Active	-1,51072	1,41454	0,682	-8,9783	5,9569
				Doxy	0,02811	0,98520	1,000	-4,4554	4,5116
	48h	Control	Active	0,07686	0,24046	0,982	-0,8853	1,0390	
			Doxy	-0,03427	0,23343	0,998	-0,9558	0,8873	
	72h	Control	Active	1,64708*	0,31386	0,016	0,4663	2,8279	
			Doxy	3,49605*	0,32925	0,001	2,2432	4,7489	

Pg	12h	Control	Active	0,77922	0,65714	0,624	-2,6087	4,1671
			Doxy	-0,44914	0,83589	0,927	-3,5963	2,6981
	24h	Control	Active	-0,50008	0,11386	0,056	-1,0218	0,0216
			Doxy	-0,15087	0,19879	0,833	-1,2628	0,9610
	48h	Control	Active	-1,52354	0,80654	0,351	-5,5021	2,4550
			Doxy	-0,03127	0,77644	1,000	-4,3419	4,2793
	72h	Control	Active	0,26850	1,22741	0,993	-6,7383	7,2753
			Doxy	3,49026	1,21418	0,198	-3,7394	10,7199
*Diferencias significativas comparado con el control (p<0,05)								