



**GENERALITAT
VALENCIANA**



**Fundación para el Fomento de la
Investigación Sanitaria y Biomédica
de la Comunitat Valenciana**

Facultad de Ciencias Biológicas

Área de Genómica y Salud

**Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la
Comunidad Valenciana (FISABIO)**



**ANÁLISIS TAXONÓMICO Y FUNCIONAL DEL MICROBIOMA
HUMANO MEDIANTE APROXIMACIONES CLÁSICAS,
MOLECULARES Y METAGENÓMICAS**

**Memoria presentada por Raúl Cabrera Rubio
para optar al grado de Doctor en Biotecnología**

Director: Alejandro Mira Obrador

Valencia 2014

"Para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea"

Alexander Fleming

Facultad de Ciencias Biológicas

Área de Genómica y Salud

**Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la
Comunidad Valenciana (FISABIO)**



**ANÁLISIS TAXONÓMICO Y FUNCIONAL DEL MICROBIOMA
HUMANO MEDIANTE APROXIMACIONES CLÁSICAS,
MOLECULARES Y METAGENÓMICAS**

**Memoria presentada por Raúl Cabrera Rubio
para optar al grado de Doctor en Biotecnología**

Director: Alejandro Mira Obrador

Valencia 2014

Don Alejandro Mira Obrador, Doctor en Ciencias Biológicas e investigador del área de Genómica y Salud de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO)

CERTIFICA: Que Raúl Cabrera Rubio, Licenciado en Farmacia por la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título: “Análisis taxonómico y funcional del microbioma humano mediante aproximaciones clásicas, moleculares y metagenómicas”, para optar al grado de doctor en Biodiversidad por la Universidad de Valencia.

Y para que conste, en el cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente certificado en Valencia, a 27 de Marzo de 2014.

Fdo.: Alejandro Mira Obrador

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director de tesis, Alex, la oportunidad que me ofreció hace años de dar a conocer mi pasión por este trabajo, y a todos aquellos que han compartido esta pasión conmigo a lo largo de los años, muchas gracias a todos por tantos buenos momentos. Por último agradecer a toda mi familia el apoyo prestado, en especial a mis padres porque sin vosotros no sería nada y a Irene por todo el apoyo prestado tanto en los buenos como en los malos momentos.

Muchas gracias a todos!

Índice general

Agradecimientos	7
I. Introducción general	15
1.1. La microbiota humana	17
1.2. Nichos del ecosistema humano bajo estudio	21
1.2.1. La cavidad oral	22
1.2.2. La leche materna	25
1.2.3. Las vías respiratorias	28
1.3. Métodos clásicos y moleculares para identificar y clasificar microorganismos	31
1.4. Trabajo de esta tesis	36
II. Objetivos	38
III. Estudios de diversidad bacteriana mediante el uso del marcador molecular 16S rRNA	
III. Capítulo 1. El microbioma de la placa dental de humanos y chimpancés	40
1.1. Introducción	40
1.2. Materiales y Métodos	42
1.2.1. Obtención de muestras	42
1.2.2. Extracción de ADN	44
1.2.3. Amplificación del DNA extraído mediante PCR	44
1.2.3.1. Clonación del producto de PCR	44
1.2.3.2. Pirosecuenciación directa del producto de PCR	46
1.2.4. Identificación taxonómica de bacterias	47
1.3. Resultados y Discusión	49
1.3.1. Determinación de la biodiversidad oral mediante clonación y pirosecuenciación ...	49
1.3.2. Número de especies esperadas	51
1.3.3. Composición bacteriana de la placa dental supragingival	52
1.3.4. Estudios de PCA	56
1.3.5. Estudios comparativos a nivel de género	57

III. Capítulo 2. Variación temporal del microbioma oral	61
2.1 Introducción	61
2.2 Materiales y Métodos	63
2.2.1. Obtención de muestras y extracción de ADN	63
2.2.2. Amplificación por PCR y pirosecuenciación	64
2.2.3. Análisis de secuencias	65
2.3 Resultados	65
2.3.1. Diversidad microbiana en la placa dental supragingival	65
2.3.2. Diversidad bacteriana de la placa dental supragingival a través del tiempo	67
2.4 Discusión	68
III. Capítulo 3. El microbioma del tracto bronquial de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	73
3.1 Introducción	73
3.2 Materiales y Métodos	75
3.2.1. Diseño del estudio y obtención de muestras	75
3.2.2. Extracción de ADN	77
3.2.3. Amplificación mediante PCR del ADN extraído	77
3.2.4. Análisis de las secuencias	78
3.3. Resultados	79
3.3.1. Elección de participantes	79
3.3.2. Diversidad microbiana en el árbol bronquial	80
3.3.3. El microbioma en los diferentes compartimentos del árbol bronquial	82
3.4. Discusión	85
III. Capítulo 4. El microbioma de la leche materna	90
4.1 Introducción	90
4.2 Materiales y Métodos	91
4.2.1. Diseño del estudio y obtención de muestras	91
4.2.2 Extracción de ADN	92
4.2.3. Amplificación por PCR y pirosecuenciación	93
4.2.4. Análisis de secuencias	93

4.3 Resultados	94
4.3.1. Diversidad bacteriana de la leche a través del tiempo de lactancia	94
4.3.2. Influencia del peso en la microbiota de la leche materna	96
4.3.3. Influencia del tipo de parto en la microbiota de la leche materna	98
4.4 Discusión	99

IV. Caracterización funcional del microbioma mediante pirosecuenciación directa

IV. Capítulo 5: El microbioma oral de humanos y chimpancés

5.1. Introducción	105
5.2. Materiales y métodos	107
5.2.1. Toma de de muestras y extracción de ADN	107
5.2.2. Pirosecuenciación directa del DNA de la placa dental	107
5.2.3. Asignación taxonómica de las lecturas	108
5.2.4. Análisis funcional de las lecturas y análisis estadístico	108
5.2.5. Asignación del metagenoma del chimpancé a especies bacterianas	109
5.3. Resultados y Discusión	110
5.3.1. El metagenoma oral del chimpancé	110
5.3.2. Comparación de tres métodos utilizados para determinar la biodiversidad oral ...	110
5.3.3. Cálculo de la diversidad esperada mediante curvas de rarefacción	111
5.3.4. Funciones sobre-representadas en la microbiota del chimpancé	112
5.3.5. Funciones sobre-representadas en humanos con caries	115
5.3.6. Funciones sobre-representadas en humanos que nunca han tenido caries ...	116
5.3.7. Funciones sobre-representadas compartidas entre chimpancés y humanos sanos ...	116
5.3.8. Presencia de funciones sobre-representadas en genomas de bacterias orales	117

V. Aplicaciones biotecnológicas mediante librerías metagenómicas y por cultivo

V. Capítulo 6. Elaboración de librerías metagenómicas de placa dental y desarrollo de un cribado de actividad antimicrobiana frente a mutans streptococci

6.1. Introducción	122
6.2. Materiales y Métodos	125
6.2.1. Obtención de muestras de la placa dental supragingival	125

6.2.2. Extracción de DNA de la placa dental supragingival	126
6.2.3. Elaboración de librerías metagenómicas de la placa dental supragingival	126
6.2.4. Ensayos de inhibición frente a <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	127
6.2.5. Extracción del ADN plasmídico de los clones positivos frente a <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	128
6.2.6. Secuenciación de los extremos de los insertos de los clones inhibitorios	128
6.2.7. Secuenciación completa de los insertos de los clones inhibitorios	129
6.2.8. Búsqueda de la fracción activa frente a <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	129
6.2.9. Identificación de los péptidos antimicrobianos en los fósmidos positivos	130
6.2.9.1. Fósmidos con insertos de pequeño tamaño (500-1500 pb)	130
6.2.9.2. Fósmidos con insertos de gran tamaño (28-34 Kb.)	130
6.2.10. Ensayos de inhibición en medio líquido e inhibición comparada frente a productos comerciales	131
6.2.11. Actividad de los péptidos sintetizados	132
6.3. Resultados	132
6.3.1. Elaboración de librerías metagenómicas en muestras de placa dental	132
6.3.2. Búsqueda de actividad inhibitoria de <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	132
6.3.3. Secuenciación completa de los fósmidos positivos frente a <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	134
6.3.3.1. Fósmidos de pequeño tamaño	134
6.3.3.2. Fósmidos de gran tamaño	134
6.3.4. Identificación de los péptidos antimicrobianos.	
6.3.4.1. Identificación de los péptidos antimicrobianos en fósmidos con insertos cortos	135
6.3.4.2. Identificación de péptidos antimicrobianos en fósmidos con insertos largos	135
6.3.5. Ensayos para la determinación de la dosis mínima inhibitoria	137
6.3.5.1. Ensayos para el fósrido S12E	137
6.3.5.2. Resultados de los ensayos de inhibición de los fósridos con insertos largos	138
6.3.6. Comparación de la actividad inhibitoria del fósrido S12E frente a Listerine	139
6.3.7. Actividad de los péptidos sintetizados	140
6.4. Discusión	140

V. Capítulo 7: Búsqueda de potenciales probióticos anticaries en aislados de placa dental . .	145
7.1. Introducción	145
7.2. Materiales y métodos	148
7.2.1. Obtención de muestras	148
7.2.2. Aislamiento y cultivo de cepas de la placa dental supragingival	149
7.2.3. Identificación taxonómica de los aislados	150
7.2.4. Pruebas de inhibición de los aislados frente a <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	151
7.2.4.1. Búsqueda de actividad antimicrobiana	151
7.2.4.2. Producción de peróxido y/o péptidos antibacterianos de los aislados . .	151
7.2.5. Determinación de la fracción inhibidora de los aislados	152
7.3. Resultados	153
7.3.1. Aislados de placa dental supragingival	153
7.3.2. Búsqueda de actividad inhibitoria de los aislados frente a <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i> . .	154
7.3.3. Producción de péptidos y peróxido	155
7.3.4. Fracción activa de los aislados positivos frente a <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	157
7.4. Discusión	159
VI. Discusión General	165
VII. Conclusiones	173
Bibliografía	177
Anexos	205

I.

Introducción general

Las bacterias y arqueas son organismos unicelulares, agrupándose en el grupo de procariotas (sin núcleo), diferenciándose en esto de los eucariotas (con núcleo). Su tamaño puede oscilar entre 0,2 μ m, como algunas especies del género *Mycobacterium*, y 5 μ m. Las bacterias se presentan con una morfología definida que está determinada por su pared rígida. Se pueden presentar con diferentes formas, esféricas (cocos), ovaladas, en forma de bastón (bacilos), espiral (espirilos), etc. La reproducción bacteriana generalmente es por bipartición, aunque existen otras formas de reproducción asexual como la gemación o la esporulación (Lodish H. y col. 2005). En condiciones apropiadas, una bacteria Gram-positiva puede dividirse cada 20–30 minutos y una Gram-negativa cada 15–20 minutos, y en alrededor de 16 horas su número puede ascender a unos 5.000 millones (aproximadamente el número de personas que habitan la Tierra).

En 1683 Anton van Leeuwenhoek con un microscopio de lente única de su propio diseño, observó en un raspado de la placa dental lo que él llamó “animálculos”, abriendo el camino a una nueva ciencia virgen por el momento llamada microbiología. Pero realmente la historia de la microbiología la inicia Robert Hooke publicando sus observaciones sobre los tejidos vegetales, observando cómo se repetían unas unidades a modo de celdillas, a las que llamó “células”. Robert Koch también estudio el ántrax, cólera y la tuberculosis e ideó una serie de pruebas para establecer la etiología de las enfermedades infecciosas con el objeto de conocer cuál es el agente infeccioso, conociéndose estas

premisas por los postulados de Koch (King LS. 1952). Se basó en el concepto de aislamiento de bacterias en cultivo puro, manteniéndose aún en nuestros tiempos.

A mediados del siglo XX, el cultivo de especies bacterianas y su posterior examen microscópico seguían siendo las principales herramientas de observación y descubrimiento, identificándose estas bacterias mediante la evaluación microscópica directa. Pero se observó que el número de bacterias detectadas mediante microscopía no podía ser reproducido mediante cultivo (Staley JT. y col. 1985), llegándose a estimar que más del 99% de las especies bacterianas no podrían cultivarse (Amann RI. y col. 1995). Por ejemplo, las estimaciones del porcentaje de bacterias cultivables en el intestino oscila en el rango del 10 al 50 %, dependiendo del estudio (Wilson KH. y Blitchington RB., 1996; Suau A. y col. 1999), y en la cavidad oral Paster BJ. y col. en el 2006 propusieron que el 50% de las bacterias que habitan este nicho no son cultivables. La resistencia de muchas bacterias a ser cultivadas podría ser debido al desconocimiento de sus requisitos de crecimiento, la tensión impuesta por el procedimiento de cultivo, y la simulación casi imposible de las interacciones entre las bacterias y de éstas con el huésped, que se producen en su entorno natural. Aunque también es cierto que el cultivo es necesario en estudios de diversidad, pues existe evidencia de que ciertas especies que se detectan por cultivo han pasado inadvertidas por técnicas moleculares, no siendo el cultivo el único método sesgado como proponen otros autores (Donachie SP. y col. 2007).

Una célula microbiana sola es, generalmente, capaz de llevar a cabo los procesos vitales de crecimiento, respiración y reproducción con independencia de otras células del mismo tipo o de tipo diferente. Entre las especies que forman una comunidad aparecen interacciones complejas. Estas pueden ser de mutualismo (ciertas bacterias forman asociaciones íntimas con otros organismos, que les son imprescindibles para su supervivencia), parasitismo (el parasitismo es un proceso por el cual una especie amplía su capacidad de supervivencia utilizando a otras especies para que cubran sus necesidades básicas y vitales) o comensalismo (debido a su pequeño tamaño, las bacterias comensales son ubicuas y crecen sobre animales y plantas exactamente igual a como crecerían sobre cualquier otra superficie) según cómo afecta a cada uno de los componentes de la interacción. Estas interacciones provocan que la comunidad posea propiedades no explicables por la mera suma de las características de sus componentes (Gross R. y col. 2003). Algunas de estas comunidades son las que viven asociadas al ser humano en los distintos nichos del cuerpo.

1.1. La microbiota humana

La microbiota humana es el conjunto de microorganismos que viven asociados en distintas partes del cuerpo humano, siendo en la mayoría de los casos una relación simbiótica comensal con el hospedador, ayudándonos estos microorganismos en funciones vitales. Las principales funciones de la microbiota son de tres tipos. En primer lugar el suministro de nutrientes esenciales (sustancias necesarias para la vida pero que no somos capaces de fabricar a partir de otros nutrientes) así como la digestión del alimento (Campbell JM. y col. 1997), la producción de vitaminas (Walther B. y col. 2013) y la detoxificación de compuestos (Arkenberg A. y col. 2011). En segundo lugar la modulación del sistema inmunitario (Schiffrin EJ. y col. 1997) y el desarrollo del mismo frente a organismos que puedan ser patógenos (Sharma A. y col. 1996). La tercera función es el antagonismo microbiano (impedir el asentamiento de microorganismos foráneos, potencialmente patógenos), por ejemplo ayudando a evitar la colonización de la piel (Cogen AF. Y col. 2008) o las mucosas (Stecher B. y Hardt WD. 2008). La microbiota humana está formada principalmente por bacterias, pero también por hongos (Ghannoum MA. y col. 2010), protozoos (Sulżyc-Bielicka V. y col. 2012), arqueas (Eckburg PB. y col. 2003) y virus (Dinsdale EA. y col. 2008), cuya presencia, diversidad y función están mucho menos caracterizadas.

El papel de muchos de estos organismos es todavía confuso. Por ejemplo, se propuso que las arqueas encontradas en los bolsillos periodontales, relacionadas con la gravedad de la periodontitis, podrían ser el primer caso de una arquea patogénica (Conway de Macario E. y col. 2009). También se conoce la presencia de hongos en medios como la vagina (Boiko AV. y col. 2001) o en la boca (Ding N. y col. 2013), y aunque tradicionalmente se trata de patógenos oportunistas, todavía está por determinar qué papel tienen en condiciones de salud. Finalmente, la fracción viral, aunque menos estudiada, puede contribuir a regular la composición de la comunidad evitando la dominancia de una sola especie o cepa bacteriana, tal como se ha descrito para ambientes de vida libre (Rodriguez-Valera F. y col. 2009).

El microbioma está formado aproximadamente por 100 billones de bacterias, superando en 10 veces el número de células de nuestro cuerpo (Savage DC. 1977). En relación con el hospedador, el contenido bacteriano no sólo es mayor, sino que el número de genes únicos bacterianos es 100 veces superior en comparación con el humano, que solo posee varias decenas de miles (Yang Y. y col. 2009).

Teniendo todo esto en cuenta, más el hecho del desconocimiento de gran parte de las especies bacterianas que habitan en un determinado ambiente por la imposibilidad de ser cultivadas (Suau A. y

col. 1999), es necesario el estudio, primeramente, de la ecología de las comunidades. Surgió cuando Pace y colaboradores, amplificaron y secuenciaron el gen ribosómico 16S ARNr (marcador taxonómico universal en arqueas y bacterias) del ADN extraído de comunidades microbianas ambientales (Pace NR. 1997). Ello permitía estudiar cualquier ambiente como el suelo, agua, etc, así como ambientes asociados a hospedadores como las heces, placa dental, etc. Tras la extracción del ADN de la muestra, éste se amplificaba con métodos estándar de PCR y el análisis de las secuencias obtenidas permitía encontrar una gran diversidad de organismos pertenecientes a grupos taxonómicos no descritos anteriormente. En los últimos 15 años se han aplicado gran variedad de enfoques moleculares basados en el gen ribosómico 16S ARNr para explorar la diversidad y la dinámica de las comunidades microbianas (Zoetendal EG. y col. 2004). La secuenciación del gen 16S ARNr permite la identificación de los microorganismos, a menudo a nivel de especie si las secuencias son lo suficientemente largas, y la detección de incluso los miembros minoritarios de la comunidad. Hasta hace poco, la secuenciación de productos de PCR era muy laboriosa y costosa, ya que requería la generación de bibliotecas de clones antes de la secuenciación por dideoxinucleótidos o secuenciación tipo Sanger, aunque por esta metodología se realizaron importantes avances en el conocimiento de ambientes como el estomago (Bik EM. Y col. 2006) o la cavidad oral (Bik EM. Y col. 2010; Gross EL. Y col. 2010). Pero con la llegada de la nueva generación de técnicas de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing, o NGS) ha sido posible la secuenciación directa de los amplicones, evitando así el paso de clonación (Metzker ML. 2010). Las nuevas plataformas de secuenciación producen un alto número de lecturas en una sola carrera, mientras que el costo se ha reducido drásticamente. Además, la secuenciación de las regiones hipervariables del gen 16S ARNr se puede combinar con el etiquetado de las muestras con secuencias de códigos de barras específicos, lo que permite la mezcla de múltiples muestras para ser secuenciados en paralelo (Sogin ML. y col. 2006; Andersson AF. y col. 2008).

Las NGS y su uso ha revitalizado la investigación sobre el microbioma humano (Turnbaugh PJ. y col. 2007, Dethlefsen L. y col. 2007), incluyendo la cavidad oral (Keijser BJF. y col. 2008, Belda-Ferre P. y col. 2012) y otros ambientes del cuerpo humano (Delgado S. y col. 2013, Dowd SE. y col. 2008, Ravel J. y col. 2010). Asimismo, la era genómica ha abierto todo un abanico de nuevas estrategias para comprender los mecanismos de patogenicidad de organismos bacterianos y su interacción con huéspedes humanos (Schoolink GK. 2002). La microbiota interviene en gran cantidad de procesos que afectan a la salud del hospedador, por lo que conocer su funcionamiento puede ser de utilidad para paliar y/o evitar ciertas enfermedades. Es por ello que los esfuerzos hacia el estudio de la microbiota humana van en aumento (Prakash S. y col. 2011). Por tanto, es necesario entender la microbiota

humana asociada para la comprensión real y total del metabolismo humano, el desarrollo del sistema inmune y la susceptibilidad a ciertas enfermedades, entre otras (Klaasen HL. y col. 1993; Stecher B. y Hardt WD. 2008).

Una aproximación muy útil al problema del estudio de las patologías humanas es mediante la genómica (proporcionando un amplio conocimiento de cada especie bacteriana sujeta a este estudio) y la metagenómica (que proporciona una perspectiva genética amplia de toda la comunidad microbiana). La metagenómica, además, proporciona el acceso a los genes de bacterias no cultivables. Inicialmente, esta técnica consistía en la extracción directa del ADN total de una comunidad microbiana, fragmentándolo e insertándolo en bacterias de laboratorio (generalmente *E. coli*), obviando así la necesidad de cultivo. Los clones obtenidos pueden entonces utilizarse para proceder a la secuenciación de los genes del ambiente o a su expresión y posterior estudio funcional, abriendo la posibilidad de que estos insertos de bacterias de un determinado ambiente puedan utilizarse para la búsqueda de sustancias de interés biotecnológico o biomédico (Lee DG. y col. 2007; Selvin J. y col. 2012). En los últimos años, el uso de métodos de secuenciación de segunda generación que no requieren el uso de cebadores ha permitido la secuenciación directa del ADN o cDNA de comunidades microbianas complejas sin necesidad de clonación (Andersson AF. Y col. 2007; Arumugam M y col. 2011).

Uno de los proyectos más importantes aplicando las técnicas de NGS al conocimiento del microbioma humano es el Proyecto Microbioma Humano (HMP). Este proyecto supone un hito en la historia biomédica, y se inició en el año 2008 por iniciativa de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos con el objetivo de identificar y caracterizar los microorganismos que se encuentran en asociación con los seres humanos sanos y enfermos y comprobar sus cambios (Madupu R. y col. 2013). Uno de los proyectos más destacables del HMP es la secuenciación de 3.000 aislados bacterianos del microbioma humano (Pei AY. y col. 2010), aportando una gran información para sucesivos análisis metagenómicos y su comparación. De esta forma, mediante la secuenciación y anotación de genomas se puede aportar información que en un futuro pueda ser empleada en el diseño de vacunas, así como para comprender mejor el conjunto de genes que puedan ser compartidos en un determinado ambiente estudiados por metagenómica.

Aunque nuestro grupo está especializado en el uso de herramientas genómicas, metagenómicas, de secuenciación masiva y bioinformáticas, también estas tienen sus limitaciones, y no hay que dejar de lado el trabajo experimental más clásico en microbiología incluyendo el cultivo, que podría contribuir

enormemente a un mejor entendimiento de las enfermedades, y búsqueda, mediante cultivo, de posibles prebióticos (alimentos que poseen sustancias que estimulan el crecimiento de microorganismos beneficiosos en la microbiota) o probióticos (microorganismos beneficiosos cuando se suministran a ciertos niveles en la alimentación), con el objetivo de producir efectos positivos para la salud humana (Reid G. y col. 2011). De esta manera, puede modificarse la composición de la microbiota para que ésta nos haga menos susceptibles a la enfermedad y sea capaz de desplazar a los patógenos o evitar que sea colonizada por éstos (Ross KF. y col. 1993, Belda-Ferre P. y col. 2011, Bejar W. y col. 2013), ya que los microorganismos han sido determinantes en la evolución del hombre (Fraune S. y Bosch TC. 2010) y son fundamentales para el desarrollo y mantenimiento de su salud. En general, esta estrategia de búsqueda de cepas avirulentas que puedan inhibir o evitar el asentamiento de especies o cepas virulentas se conoce con el término de “Terapia de Reemplazo” (Tagg JR. y Dierksen KP. 2003).

Mediante el cultivo de estas bacterias comensales y patógenas, se puede obtener información acerca de su papel funcional y ecológico en las comunidades asociadas con condiciones de salud o enfermedad, así como los patrones de susceptibilidad a los antibióticos y otros agentes antimicrobianos. Pero hay que tener en cuenta que muchas bacterias no han podido ser cultivadas y caracterizadas fenotípicamente porque su abundancia en un determinado ambiente es muy baja, identificándose solamente las especies más dominantes o porque se trata de especies de crecimiento lento. No es difícil comprender que muchas bacterias no pueden prosperar en las condiciones artificiales de cultivo *in vitro* (Dethlefsen L. y col. 2007), mientras que en el entorno natural, se cumplen las condiciones óptimas para el crecimiento, incluyendo nutrientes, factores de crecimiento, moléculas de señalización, tensión de oxígeno, y otras condiciones físico-químicas, así como relaciones simbióticas entre organismos que necesiten unos de otros para su crecimiento. Para que estas bacterias puedan ser cultivadas en el laboratorio, se requeriría que estas condiciones se reproduzcan correctamente.

Incluso mediante aproximaciones independientes del cultivo, el estudio de la microbiota humana es muy complejo, ya que se conoce que la composición, en términos de diversidad bacteriana, es muy variable entre individuos, a nivel temporal y por supuesto dependiendo de la región del cuerpo a estudio como se muestra en la Figura I.1 (Costello EK. y col. 2009). Esta variabilidad en parte es debida a que constantemente estamos en contacto con infinidad de microorganismos presentes en el ambiente o en los alimentos que ingerimos. La microbiota humana difiere en carga y composición de microorganismos según la región del cuerpo humano. En esta tesis vamos a estudiar tres diferentes nichos como son la placa dental de la boca, las vías aéreas y la leche materna, por lo que previamente

pasamos a describir el ambiente conocido de estos tres compartimentos.

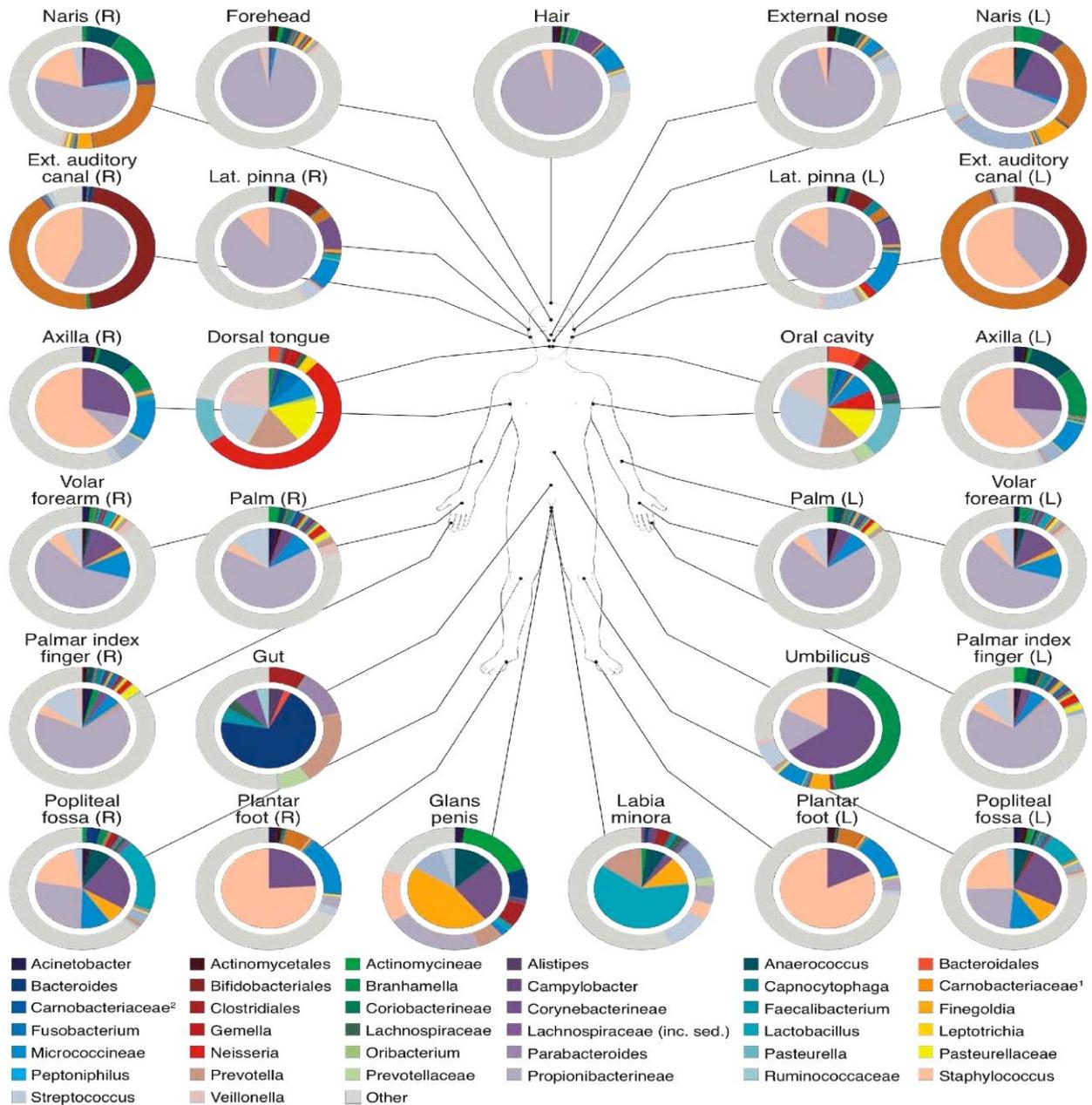


Figura I.1. Composición del microbioma humano según distintas regiones del cuerpo (Costello y col. 2009). Se observa que la microbiota es específica del nicho humano concreto.

1.2. Nichos del ecosistema humano bajo estudio.

A continuación, se describen los tres nichos ecológicos estudiados en la presente tesis, cada uno con sus características específicas que condicionan la microbiota que habita en ellos.

1.2.1. La cavidad oral.

La cavidad oral es un complejo ecosistema con una diversidad bacteriana espectacular (Simmonds RS. y col. 2000) constando de diferentes partes que contienen una composición específica de sus comunidades microbianas (Segata N. y col. 2012; Simon-Soro A. y col. 2013). Las partes que forman la cavidad oral son la lengua, los dientes, mucosa, el paladar y la encía (Figura I.2), demostrándose por métodos de cultivo y de base molecular que albergan una microbiota distinta (Aas y col. 2005).



Figura I.2: Partes de la cavidad oral

La cavidad oral está habitada por cientos de especies de bacterias (Bik EM. y col. 2010). La mayoría son comensales y necesarias para mantener el equilibrio en el ecosistema de la boca. Pero hay algunas de estas bacterias que pueden desempeñar un papel clave en algunas de las enfermedades bucales como la halitosis (mal aliento), caries dental y las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis) (Marsh PD. 2010). Un factor muy importante con el que se puede iniciar una enfermedad oral es mediante el crecimiento de la placa dental, una biopelícula constituida por el cúmulo de bacterias y productos extracelulares, y que se adhiere a la película amorfa que hay sobre la superficie limpia del diente, formada por glucoproteínas salivares (Marsh PD. 2006). Distintos organismos se van sucediendo en la placa, que comienza por cocos y bacilos gram-positivos sobre el área supragingival (en principio aerobia) y sobre la que van apareciendo bacilos gram-negativos anaerobios, que se introducen en el área subgingival. La placa dental supragingival se forma sobre las superficies de los dientes e incluye bacterias acidogénicas y acidófilas, que son responsables de la caries dental; y la subgingival que se forma en el surco gingival por bacterias que sobreviven a pH neutro y alcalino, pudiendo ser responsables de las enfermedades periodontopáticas.

Por el momento no hay consenso respecto a los mecanismos patogénicos de las enfermedades orales. La complejidad de la comunidad bacteriana de la placa dental ha dificultado la determinación de un único agente bacteriano responsable de la caries, además de que en esta enfermedad intervienen otros factores como la dieta, educación, hábitos de higiene, etc. siendo por tanto multifactorial (Figura I.3). Sin embargo, hay evidencia considerable de que *S. sobrinus* y sobre todo *S. mutans* están implicados como organismos causantes de la caries dental, habiéndose identificado cruciales factores de colonización (Kleinberg I. 2002). Varias formas de enfermedades periodontales están específicamente

asociadas a ciertas bacterias subgingivales. *Porphyromonas gingivalis*, por ejemplo, parece estar involucrada en la periodontitis del adulto, y es la bacteria mejor estudiada de la placa dental. Forma parte del llamado "complejo rojo" de bacterias periodontales por asociarse con *Treponema denticola* y *Tannerella (Bacteroides) forsythia*, y la correlación de este grupo con el desarrollo de la enfermedad (Socransky SS. y col. 1998).

La caries dental se considera la enfermedad infecciosa más extendida en el mundo, afectando, según la OMS, a entre el 60% y el 90% de la población escolar y a la gran mayoría de adultos (Petersen PE. 2004). La cavidad oral proporciona además una puerta de entrada entre el ambiente externo y el sistema gastrointestinal. La higiene oral y la pérdida de dientes pueden potencialmente afectar la flora gastrointestinal y el estado nutricional, y por lo tanto puede tener implicaciones para el desarrollo de enfermedades crónicas. Por ejemplo, mala higiene bucal, pérdida de dientes o ambos han sido correlacionados con enfermedades del tracto digestivo, incluyendo cáncer oral, gástrico y del esófago (Abnet CC. y col. 2001). Varios estudios sugieren que la placa dental es un reservorio de *Helicobacter pylori* (Song Q. y col. 2000), bacteria que cuando se encuentra en el tracto digestivo es un conocido factor de riesgo para úlcera y cáncer gástrico. Recientemente se ha propuesto que la pérdida de dientes puede estar asociada con el cáncer de páncreas, al igual que la seropositividad de *H. pylori* (Stolzenberg-Solomon RZ. y col. 2001). Por lo tanto, un mejor conocimiento del ecosistema bucal y las inter-relaciones entre los microorganismos que la habitan es fundamental no sólo para enfermedades de la boca sino también para otras enfermedades del aparato digestivo y cardiovascular que se ven influenciadas por la microbiota oral. Es por ello sorprendente la inexistencia de estrategias eficaces frente las enfermedades orales a pesar de su impacto dramático en la salud humana. Por ello la presente tesis realiza un esfuerzo en el estudio de la microbiota oral, y en concreto aquella asociada a la caries dental. Como la mayoría de las biopelículas, la placa dental se basa en un proceso continuo de colonización que se caracteriza por la sucesión de diferentes especies de bacterias, cada una con funciones relevantes en cada paso de la formación del biofilm (Kolenbrander PE. y col. 2002). La

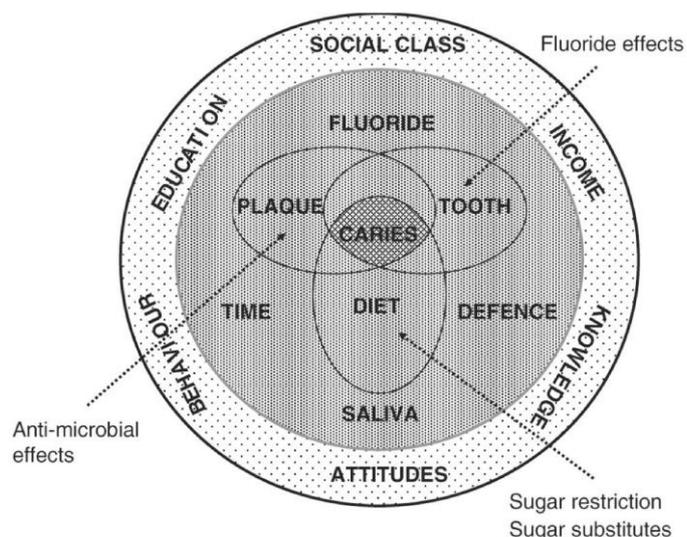


Figura I.3: Factores involucrados en el desarrollo de la caries (Ten Cate J. 2009). Las flechas indican posibles estrategias terapéuticas.

enfermedades de la boca sino también para otras enfermedades del aparato digestivo y cardiovascular que se ven influenciadas por la microbiota oral. Es por ello sorprendente la inexistencia de estrategias eficaces frente las enfermedades orales a pesar de su impacto dramático en la salud humana. Por ello la presente tesis realiza un esfuerzo en el estudio de la microbiota oral, y en concreto aquella asociada a la caries dental. Como la mayoría de las biopelículas, la placa dental se basa en un proceso continuo de colonización que se caracteriza por la sucesión de diferentes especies de bacterias, cada una con funciones relevantes en cada paso de la formación del biofilm (Kolenbrander PE. y col. 2002). La

formación de la biopelícula oral consta de tres etapas principales: 1) fijación; 2) colonización; y 3) desarrollo de la biopelícula (Hojo y col. 2009).

La caries dental tiene su origen en una comunidad microbiana muy compleja, siendo ésta una de las principales razones por la que los patógenos orales no han sido identificados ni esta enfermedad erradicada. El estudio de las enfermedades orales y su prevención es complicado, debido a tres factores: En primer lugar, la complejidad del ecosistema (varios cientos de especies) hace que las potenciales especies patogénicas sean difíciles de identificar (Socransky SS. y col. 1998). En segundo lugar, no hay un solo agente etiológico que puede ser identificado en base a los principios clásicos de los postulados de Koch. Esto ha sido claramente demostrado en la enfermedad periodontal, donde se conocen al menos tres especies bacterianas que pertenecen a muy diferentes grupos taxonómicos que están implicados en la enfermedad, como es el llamado “complejo rojo” de los patógenos periodontales (Darveau RP. 2010) y un origen polimicrobiano se ha propuesto también para la caries dental (Belda-Ferre P. y col. 2012, Simón-Soro A. y col. 2013); y tercero, una gran proporción de las bacterias orales no puede ser cultivada (Paster BJ. y col. 2001), mostrando una imagen incompleta de las comunidades microbianas que habitan en la placa dental mediante los enfoques microbiológicos tradicionales, como el cultivo (Crielaard W. y col. 2011). Sin embargo, el desarrollo de técnicas de metagenómica y las tecnologías de secuenciación de última generación (NGS) permiten el estudio de las comunidades bacterianas completas mediante el análisis total de ADN a partir de muestras microbianas de origen humano.

Utilizando métodos de NGS y análisis del gen 16S ARNr, se ha estimado que la diversidad microbiana de la cavidad oral está compuesta por miles de especies (Keijser BJ. y col. 2008), aunque los datos más recientes utilizando secuencias de mayor longitud han limitado estas estimaciones a unos pocos cientos (Ahn J. y col. 2011; Belda - Ferre y col. 2012; Bik y col. 2010). Contrariamente a los postulados de Koch, la caries dental no se considera etiológicamente el resultado de un agente único, sino que se asocia a un desequilibrio de las especies microbianas que sinérgicamente causan la desmineralización del esmalte por su actividad acidogénica (Marsh PD. 2006). Pero no solo el pH es importante en el nicho oral, también lo son otros factores como el oxígeno, la temperatura, o potencial redox, entre otros, pudiendo influir en la colonización de microorganismos y el riesgo de la enfermedad (Fejerskov O. y col. 1994). Por lo tanto, la caracterización de la composición de las comunidades bacterianas enteras y sus interacciones es vital para entender la dinámica de la comunidad en condiciones de salud y enfermedad (Jenkinson HF. y Lamont RJ. 2005)

1.2.2. La leche materna.

En los últimos años se han vuelto a destacar los beneficios inigualables tanto para la madre como para el bebé de la alimentación de éste mediante la leche materna. Muchos son los aspectos positivos a destacar durante la lactancia, desde los biológicos o psicoafectivos, a los económicos y sociales. Cabe resaltar los aspectos positivos que la lactancia supone al bebé en el desarrollo, la maduración del sistema nervioso central y en la protección inmunológica. Es por ello que la leche materna es importantísima en el primer estadio de vida del niño, pudiendo éste alimentarse exclusivamente al pecho durante los seis primeros meses (Hendricks KM. Y col. 1992).

La leche materna contiene todos los elementos indispensables para el recién nacido (Prentice AM. y col. 1996), y además le otorga protección contra las enfermedades (Garza C. y col. 1987). La composición de la leche materna es la siguiente:

- Agua : La leche materna contiene un 88% de agua y su osmolaridad semejante al plasma, permitiendo al niño mantener un perfecto equilibrio electrolítico.

- Proteínas: Entre los mamíferos, la leche humana madura posee la concentración más baja de proteína (0,9 g/100 ml). Sin embargo es la cantidad adecuada para el crecimiento óptimo del niño. La proteína de la leche humana está compuesta de 30% de caseína y 70% de proteínas del suero. La caseína está formada por micelas complejas de caseinato y fosfato de calcio. Las proteínas del suero son entre otras: alfa-lactoalbúmina (de alto valor biológico para el niño), seroalbúmina, beta-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lactoferrina (acción bacteriostática sobre ciertos gérmenes ferrodpendientes (como *E. coli*), contribuye a la absorción del hierro en el intestino del niño (Räihä NC. 1985)), lisozima, enzimas, moduladores del crecimiento, hormonas y prostaglandinas. Ocho de los veinte aminoácidos presentes en la leche son esenciales y provienen del plasma de la madre. El epitelio alveolar de la glándula mamaria sintetiza algunos aminoácidos no esenciales. La taurina es un importante aminoácido libre de la leche materna, que el recién nacido no es capaz de sintetizar. Es necesario para conjugar los ácidos biliares y como posible neurotransmisor o neuromodulador del cerebro y la retina (Sturman JA. y col. 1977).

- Hidratos de carbono: La lactosa de origen humano es el principal carbohidrato presente en la leche materna. La lactosa es un disacárido sintetizado en la glándula mamaria a partir de glucosa y

galactosa. La leche humana tiene un alto contenido de lactosa, 7 g/dl (cerca de 200mM) y aporta, junto con la grasa, la energía necesaria para el normal crecimiento y desarrollo del bebé. Provee el 40% de la energía, pero además tiene otras funciones, como facilitar la absorción del calcio. Favorece la implantación de una microbiota acidófila.

- Lípidos: Las grasas presentes en la leche materna representan una importante fuente de energía para el bebé y aportan aproximadamente el 50% de las calorías totales. Son fuente de ácidos grasos esenciales y vehículo de las vitaminas liposolubles, cuya absorción favorecen.

- Minerales: La concentración de minerales está adaptada a los requerimientos nutricionales y capacidad metabólica del niño. La leche materna presenta alta biodisponibilidad de minerales, en especial de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc. Estas particularidades serían las principales causas de la mejor absorción de estos nutrientes.

- Vitaminas: La leche de una madre bien nutrida presenta cantidades suficientes de vitaminas para el normal crecimiento del bebé (Lönnerdal B. 1985) sólo con la excepción de algunas, como la vitamina K que se encuentra en cantidades muy bajas.

La composición de la leche materna puede estar influenciada por la dieta de la madre y el medio ambiente. La leche materna no tiene una composición estática y sus constituyentes cambian durante el período de lactancia, no teniendo las mismas características a lo largo de la misma. Al principio, la leche es más acuosa y rica en proteínas, minerales, vitaminas hidrosolubles y lactosa. Al finalizar es de color más blanco, con más grasa y vitaminas liposolubles. La lactancia materna puede dividirse en cuatro fases: calostrál, transicional, madura e involucional. La composición de la leche materna cambia durante el curso de la lactancia, pero con mayor rapidez las primeras semanas (Sala-Vila A. y col. 2005; Hall B. 1979), siendo la producción variable entre individuos e influida por factores psicológicos, fisiológicos y sociológicos, relacionados con frecuencia entre sí.

La leche materna es rica en inmunoglobulinas (especialmente en el calostro); la principal es la IgA secretora, con menores cantidades de IgA monomérica, IgG e IgM. Se sintetiza en la glándula mamaria y su función es la de formar anticuerpos capaces de unirse a virus y bacterias, siendo una función vital para el recién nacido en las primeras etapas de la vida (Xanthou M. 1998).

Todo ello remarca la importancia de la nutrición y dieta durante los primeros estadios de la vida, al influir tanto en el crecimiento y desarrollo corporal del niño como en la prevención de futuras enfermedades en el adulto. La leche materna es considerada como el “gold standard” de la alimentación infantil y su papel va más allá de la nutrición. En la actualidad, la práctica totalidad de entidades científicas reconocen la leche materna como el alimento de elección para los lactantes durante el primer semestre de vida (OMS/UNICEF 2003, Unión Europea 2006, Asociación Española de Pediatría, 2009).

En los últimos años se está confirmando la hipótesis de que este fluido no es estéril como se suponía (Martín R. y col. 2007) sino que más bien se encuentra poblado por bacterias que pueden llegar al intestino del recién nacido (Gueimonde M. y col. 2007). Alteraciones en la microbiota de la leche materna, junto con otros factores genéticos y/o ambientales podrían contribuir al desarrollo de algunas enfermedades como alergias, enfermedad atópica, las enfermedades del intestino irritable, enfermedad celíaca, diabetes y también, obesidad (Collado MC. y col. 2008; Kalliomäki M. y col. 2008; Collado MC. y col. 2009; Larsen N. y col. 2010).

El bebé nace, en principio, en un ambiente estéril y el primer contacto se produce a través del canal del parto en el que la microbiota vaginal y la microbiota intestinal materna actúan presumiblemente como inóculo para el desarrollo de la microbiota neonatal (Wall R. Y col. 2009). La microbiota neonatal es un ecosistema complejo que incluye diversas especies bacterianas que llevan a cabo un amplio espectro de actividades relacionadas con la nutrición, metabolismo y estimulación del sistema inmune. Esta colonización inicial es influenciada a posteriori por el tipo de alimentación, fundamentalmente por el seguimiento de la lactancia materna, encontrándose diferencias en los lactantes alimentados con leches de fórmula (no conteniendo bifidobacterias, lactobacilos y enterococos) pudiendo dar lugar a una incompleta maduración del sistema inmunitario (Le Huërou-Luron I. y col. 2010).

La leche materna es un fluido biológico, complejo y vivo que se adapta a los requerimientos nutricionales e inmunológicos del bebé a lo largo de la lactancia (calostro, leche de transición y leche madura) en función de las necesidades energéticas y del desarrollo del recién nacido. La leche materna además de los componentes nutritivos, contiene componentes inmunológicos y factores prebióticos (oligosacáridos) y probióticos (microorganismos) que influyen decisivamente en el desarrollo de la microbiota intestinal y posiblemente en la microbiota oral. Sin embargo, el papel biológico de las

bacterias presentes en la leche materna es aún desconocido. Los datos disponibles hasta la fecha indican que las especies más abundantes en la leche materna se corresponden a las bacterias ácido lácticas (Rodríguez NA. y col. 2008; Collado MC. y col. 2008; 2009).

Históricamente los estudios sobre la leche materna han ido dirigidos a sus nutrientes, como ácidos grasos, vitaminas y minerales. Trabajos recientes han evidenciado que las comunidades bacterianas pueden también proporcionar beneficios a este alimento contribuyendo, entre otros, al mantenimiento de la salud de la glándula mamaria y a la del bebé, por lo que se hace necesario el desarrollo de diversos estudios orientados a establecer la composición de la microbiota. Por ello, el desarrollo y aplicación de nuevos métodos metagenómicos suponen un gran avance para el estudio de la microbiota, y entender su efecto en el desarrollo y la salud infantil. Estos métodos también pueden ayudar a dilucidar el origen de la microbiota de la leche materna, siendo hasta el momento la vía de transmisión de bacterias del intestino humano a la glándula mamaria, denominada vía enteromamaria, la sugerida por varios autores como la más probable (Perez PF. y col. 2007; Donnet-Hughes A. y col. 2010). En 2001 Rescigno M. y colaboradores describieron cómo células dendríticas podían penetrar en el epitelio intestinal para tomar las bacterias comensales desde el lumen intestinal, llegando a la circulación sistémica (Macpherson AJ. y col. 2004). Recientemente, se ha propuesto la transferencia de las bacterias intestinales a las glándulas mamarias dentro de las estas células dendríticas (Thavagnanam S. y col. 2008; Qutaishat SS. y col. 2003). Sin embargo, los interrogantes respecto a la ruta de transmisión de bacterias a la leche materna son numerosos y la vía de transmisión debe ser investigada.

1.2.3. Las vías respiratorias.

La finalidad fundamental del aparato respiratorio es el intercambio gaseoso del aire con los tejidos y el transporte del anhídrido carbónico hacia el exterior del organismo. Así, mediante difusión, enriquece la sangre en oxígeno y elimina el dióxido de carbono al exterior. Asimismo, influye en la regulación de su temperatura, sobre el metabolismo de algunos elementos y la protección frente a sustancias dañinas inhaladas. Si la respiración es profunda y lenta, las partículas pueden alcanzar zonas más profundas; en cambio, una

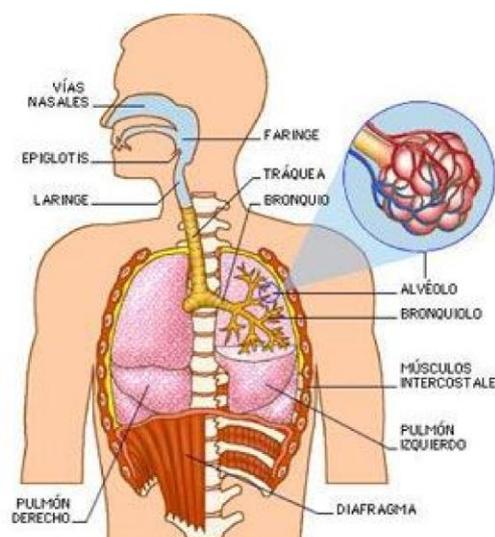


Figura I.4: Estructuras del Aparato Respiratorio

respiración superficial y rápida hace que las partículas se queden en las zonas más externas.

Las estructuras que conforman el aparato respiratorio son, a grandes rasgos, la nariz, los senos paranasales, la nasofaringe, la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos, los alvéolos y los capilares pulmonares (Figura I.4). Cada una de ellas posee una función específica. El aparato respiratorio está dividido en dos sectores anatómicos: alto y bajo. Se considera que en el sujeto sano solamente el árbol respiratorio alto (fosas nasales y faringe) presenta microorganismos, mientras que los senos nasales, el oído medio, la tráquea, los bronquios pulmonares y la pleura son estériles (Flanagan JL. y col. 2007). Otros estudios realizados por cultivo corroboran esto, mostrando que en condiciones normales no existen bacterias más allá de la glotis (Cabello H. y col. 1997). En el caso de infecciones pulmonares la microbiota orofaríngea puede verse implicada (Flanagan JL. y col. 2007). En general, eso ocurre en pacientes que tienen alterados sus reflejos defensivos. Por ejemplo, el tabaquismo puede disminuir la capacidad de los macrófagos alveolares para fagocitar microorganismos que, junto con la depresión de la función ciliar, puede manifestarse en una bajada en la resistencia neta a la infección (Harris JO. y col. 1970).

Todo el epitelio que rodea las vías respiratorias está cubierto por una capa mucosa con cilios, y los reflejos como la tos, el estornudo o la broncoconstricción son otros mecanismos de defensa importantes que actúan eliminando físicamente bacterias y partículas enviándolas otra vez hacia el exterior o desviándolas al sistema digestivo para que sean digeridas (Chaudhuri N. y col. 2005). El sistema inmune también interviene en la protección de las infecciones bacterianas (Diamond G. y col. 2000). De hecho, la mucosa del epitelio respiratorio es rica en IgA, mientras que a nivel pulmonar los macrófagos alveolares se encargan de la protección fagocitando bacterias y otras partículas (Gerritsen J. 2000).

En individuos sanos el árbol bronquial se considera eminentemente estéril. No obstante, en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) a menudo se recuperan microorganismos de las secreciones bronquiales durante los periodos de estabilidad clínica y, especialmente, durante los episodios de exacerbación, cuando los inóculos de los mismos son más elevados (Rosell A. y col. 2005; Wilkinson T. y col. 2006). La presencia de microorganismos en la vía respiratoria inferior de los pacientes con EPOC se considera que puede ser importante en la evolución de la enfermedad. Los estudios que han analizado la microbiología de la exacerbación de la EPOC han llegado a la conclusión de que existen uno o más microorganismos en la etiología de más de la mitad de

las exacerbaciones (Soler N. y col. 1998), siendo *Haemophilus influenzae* el más frecuentemente aislado (Monsó E. y col. 1995, Miravittles M. y col. 1999), aunque también *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* se han mostrado como agentes causales, en pacientes con volumen espiratorio forzado (FEV1) inferior al 50% del valor de referencia (Soler N. y col. 1998, Miravittles M. y col. 1999, Monsó E. y col. 2003). Además, la colonización bronquial es frecuente en pacientes con EPOC aunque se haya estabilizado clínicamente después de una exacerbación (Monsó E. y col. 1995), y se ha observado que una cuarta parte de los pacientes con EPOC moderada están colonizados en sus periodos de estabilidad clínica (Rosell A. y col. 2005, Monsó y col. 1999). Estudios longitudinales han demostrado, sin embargo, que en la mayoría de pacientes con EPOC los microorganismos colonizadores varían en el tiempo, y que la persistencia de la misma cepa colonizante sólo se observa en un 15% de los pacientes (Marin A. y col. 2010). Además, una colonización temprana por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis* aumenta las posibilidades de adquirir sibilancias o incluso asma durante la infancia (Bisgaard H. y col. 2007).

El estudio de la biodiversidad microbiana en muestras clínicas se ha fundamentado en el cultivo. El aislamiento a partir de muestras de secreciones respiratorias requiere del uso de medios selectivos adaptados al cultivo de diferentes microorganismos, principalmente *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, que a menudo no son capaces de aislar microorganismos de crecimiento difícil, y pueden contaminarse por especies ambientales. Así, la estimación de la diversidad microbiana por los métodos de cultivo está necesariamente sesgada, y puede no ser representativa de la variabilidad real en muestras de secreciones respiratorias.

Las especies que colonizan la mucosa bronquial son responsables de infecciones en pacientes con EPOC (Rogers AV. y col. 2008), aunque la información sobre diversidad microbiana en muestras respiratorias es escasa y principalmente basada en el cultivo. En algunos casos, aproximaciones moleculares basadas en la amplificación del gen 16S ARNr y su clonado se han llevado a cabo en muestras de esputo de individuos con fibrosis quística y EPOC (Bittar F y col. 2008, Rogers GB. y col. 2009). A pesar del limitado número de clones (20-50), los datos disponibles han mostrado la presencia de especies no detectadas previamente y con probable relevancia. Pero el coste y el tiempo requerido han limitado sin embargo el número de clones obtenidos o secuenciados que, en el mejor de los casos, ha sido de varios centenares por muestra. En los últimos años, la llegada de las técnicas metagenómicas, que permiten estudiar directamente el ADN obviando la necesidad de cultivo, y las técnicas de secuenciación de última generación, que han reducido los costes del procesado, han abierto nuevas

posibilidades en el campo de la microbiología (Medini D. y col. 2008). La aplicación de estas nuevas tecnologías al estudio de la diversidad microbiana en muestras de individuos sanos y de pacientes enfermos ayudará a determinar la contribución de determinadas especies al desarrollo de las enfermedades. Por ello, es deseable el estudio de la diversidad procariota en muestras de moco de individuos control y de pacientes con distintas patologías mediante aproximaciones de alto rendimiento como la pirosecuenciación, que puede evidenciar una diversidad mucho mayor de la previamente reconocida y conllevar gran trascendencia para la salud pública.

Las técnicas convencionales de aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las secreciones respiratorias de los pacientes con EPOC son, hasta ahora, la base para el manejo terapéutico durante la exacerbación y la estabilidad de la enfermedad. Para ello, los métodos de cultivo utilizados se han adaptado a aislar aquellos microorganismos más comúnmente involucrados en las infecciones bronquiales observadas en estos pacientes. Esta situación, sin embargo, no permite evaluar la diversidad microbiana de las secreciones respiratorias, ni detectar microorganismos no considerados como habituales causantes de infección, que podrían participar en la fisiopatología de la enfermedad. La amplificación de genes concretos seguida de pirosecuenciación presenta ventajas considerables para describir y detectar especies previamente no reconocidas, y así determinar si la población microbiológica en muestras respiratorias de los pacientes con EPOC es más compleja de lo previamente conocido, además de validar qué muestra tomada de las vías respiratorias es la más adecuada y representativa de las vías inferiores.

Los estudios de análisis moleculares de alto rendimiento son necesarios para conocer mejor la biodiversidad microbiana, su papel en la fisiopatología y el desarrollo de las infecciones respiratorias crónicas de la EPOC. Esta información es importantísima en el ámbito clínico, detectando posibles nuevos y desconocidos, hasta la fecha, microorganismos no convencionales, que puede llevar a examinar nuevos agentes terapéuticos que actúen sobre ellos.

1.3. Métodos clásicos y moleculares para identificar y clasificar microorganismos.

Hacia mediados y finales del siglo XX, el cultivo de bacterias y su examen microscópico seguían siendo las principales herramientas de estudio para los microbiólogos. Por lo que el estudio de una determinada comunidad microbiana en un ambiente se realizaba mediante evaluación microscópica directa, el uso de pruebas bioquímicas, y las técnicas de cultivo de enriquecimiento. Sin embargo, la

diversidad observada a través del microscopio no podía ser explicada mediante lo cultivado en medios de cultivo enriquecido (Staley JT. y Konopka A. 1985).

En la práctica, la taxonomía procariota utiliza métodos fenotípicos y genotípicos para la identificación y descripción de sus taxones. Como hemos comentado la caracterización fenotípica estudia rasgos morfológicos, metabólicos, fisiológicos y químicos de la célula. La caracterización genotípica estudia los aspectos comparativos de las células al nivel de su genoma. En taxonomía de procariotas, la asignación taxonómica, como la historia evolutiva de los microorganismos, se lleva a cabo en base a los datos genéticos, principalmente del gen 16S ARNr. Los rRNA y los genes que los codifican fueron los primeros marcadores moleculares utilizados para establecer las relaciones filogenéticas en los procariotas (Sogin SJ. y col., 1971; Woese CR. y col. 1974). El rRNA tiene una función universal y constante que ha presentado un elevado grado de conservación desde las primeras etapas de la evolución. La mayoría de los estudios de diversidad bacteriana medioambientales están basados en el análisis de la subunidad pequeña del gen ribosómico 16S ARNr (Woese CR. y Fox GE. 1977). Este gen codifica para un RNA que forma parte de la subunidad 30S del ribosoma de los procariotas. Está presente en todas las bacterias y está lo suficientemente conservado como para poder alinear de forma precisa las posiciones homólogas de unas especies con otras. Además, los genes ribosómicos son buenos marcadores moleculares por presentar distinta tasa de evolución a lo largo de sus secuencias, de modo que hay alternancia de regiones conservadas y variables como para llevar a cabo análisis filogenéticos (Clarridge JE. 2004; Turnbaugh PJ. y col. 2007; Woese CR. y col. 1990). El uso del análisis comparado de la secuencia del gen 16S ARNr ha sido muy importante para el desarrollo de la taxonomía moderna de los procariotas. A pesar de varios posibles problemas de interpretación hay dos motivos principales para ello: la información contenida en este marcador es muy superior a sus alternativas y la calidad de las bases de datos disponibles permite tener buena resolución prácticamente hasta nivel de especie (Ludwig W. 2007).

La mayoría de métodos de asignación taxonómica requieren no sólo que la bacteria sea cultivable sino que seamos capaces de aislarla, lo cual restringe enormemente el número de bacterias a estudiar. De hecho, somos incapaces de cultivar la mayoría de especies bacterianas y, según las últimas estimaciones, solamente en 8 de los 28 phyla bacterianos conocidos hay especies cultivables en la actualidad (Achtman M. y Wagner M. 2008). Uno de los argumentos que explican nuestra incapacidad para cultivar la mayoría de las bacterias es que no disponemos de información suficiente para el desarrollo de medios de cultivo, ya que no conocemos todas las concentraciones y proporciones de

oligoelementos y sustratos requeridos, aunque, de hecho, poco a poco se están haciendo avances en esta dirección (Kaeberlein T. y col. 2002; Stevenson BS. y col. 2004), incluidos nuevos métodos de cultivo para bacterias del microbioma humano (Tian Y. y col. 2010). Otras especies bacterianas son capaces de entrar en un estado viable no cultivable o inactivo y, a pesar de tener las condiciones óptimas para crecer, necesitan una señal para activarse. Algunas de estas señales pueden ser moléculas involucradas en quorum sensing y transducción de señales, como el AMP cíclico y las acil-homoserina-lactonas (Bruns A. y col. 2002; Stevenson BS. y col. 2004; Zengler K. 2009).

En las últimas décadas, se han desarrollado técnicas moleculares de análisis que no dependen del cultivo. En 1980, Carl Woese y colegas proporcionaron una visión general de la filogenia bacteriana basándose en secuencias de 16S ARNr, independientes de características morfológicas y bioquímicas que siempre habían sido utilizados para clasificar las bacterias (Fox GE. y col. 1980, Woese CR. 1987). También se utilizó para identificar bacterias en comunidades mixtas sin necesidad de cultivo (Stahl DA. y col. 1984). Poco después, con el desarrollo de la PCR y la secuenciación, todo se agilizó mediante la clonación y posterior secuenciación clásica (método Sanger) del gen 16S ARNr usando cebadores universales que permiten un análisis más profundo de las comunidades microbianas (Giovannoni SJ. y col. 1990). La clonación directa de ADN ambiental fue sugerida por primera vez por Olsen y colegas en la década de los 80s (Olsen GJ. y col. 1986). Esta metodología ha servido durante años para describir la composición de una variedad de comunidades (Broderick NA. y col. 2004; Hayashi H. y col. 2005). Otras técnicas independientes de cultivo y mediante secuenciación clásica se han desarrollado, como la hibridación con sondas fluorescentes al gen 16S ARNr llamado hibridación fluorescente in situ (FISH) (Amann RI. y col. 1990; Amann RI. y col. 1995; DeLong E. y col. 1989), la técnica del fingerprinting ó T-RFLP, fragmentos separados mediante un gel de gradiente desnaturizante del gen 16S ARNr ó DGGE (Muyzer G. 1999), etc.

La tecnología clásica de secuenciación (Método de Sanger) fue la dominante durante dos décadas para la comparación de secuencias del gen 16S ADNr si se quería caracterizar la composición de una comunidad bacteriana hasta la entrada de los nuevos métodos de secuenciación masiva. Los nuevos métodos de secuenciación masiva, como 454 (Roche), Solexa (Illumina) y SOLiD (ABI), no requieren el laborioso y costoso paso de la construcción de las librerías ya que permiten secuenciar los productos de PCR de forma directa. Otra ventaja de estos métodos es la enorme profundidad de secuenciación comparada con la secuenciación Sanger tradicional y en un tiempo mucho más reducido.

En el año 2006, Mitchell Sogin y colaboradores publicaron un estudio en el que introdujo la posibilidad de acceder a los miembros aislados de varias comunidades microbianas al mismo tiempo mediante la amplificación y secuenciación de la región hipervariable V6 del gen 16S ARNr mediante el uso de cebadores de pirosecuenciación con código de barras (Sogin ML. y col. 2006). Los códigos de barras son secuencias cortas de nucleótidos (entre 3 a 9 nucleótidos) incorporados directamente en 5' de la secuencia del cebador y se utilizan para diferenciar las muestras en la pirosecuenciación, que de esta manera pueden mezclarse en el mismo pocillo. Desde 2006, la pirosecuenciación se ha utilizado para explorar una gran variedad de comunidades bacterianas ambientales, siendo en 2008 cuando se empezó a estudiar en diferentes nichos del cuerpo humano, siendo el primero la microbiota gastrointestinal (Andersson AF. 2008). Desde entonces se han estudiado diferentes nichos del cuerpo humano, algunos tan desconocidos y extremos como la mucosa del estomago (Delgado S. y col 2012).

También en el año 2006, Forest Rohwer y colaboradores publicaron el primer análisis metagenómico de la comunidad microbiana del agua de una mina de hierro en Minnesota, realizada mediante clonación del ADN ambiental y posterior secuenciación tradicional desde los extremos del vector (Edwards R. y col. 2006). Aunque la metagenómica en sus primeros pasos mediante secuenciación Sanger supuso un gran hito, el enorme aumento en el número de secuencias obtenidas con estos métodos de secuenciación masiva permitió abordar mucha más diversidad. Aún si una importante limitación era la longitud de las secuencias obtenidas, hoy en día las lecturas de pirosecuenciación alcanzan las 500-800bp de media. A pesar del avance que esto implica, el cuello de botella está actualmente en nuestra capacidad de análisis informático. Para resolver este problema se han desarrollado programas para filtrar, recortar, clasificar, asignar, comparar, alinear y estimar comunidades microbianas como la Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole JR. y col. 2014), QIIME (<http://qiime.sourceforge.net/>; Caporaso JG. y col. 2010), mothur (<http://www.mothur.org>; Schloss PD. y col. 2009), y VAMPS (<http://vamps.mbl.edu/index.php>), entre otros. También existen completas bases de datos de genes rRNA 16S ARNr donde los datos genéticos generados por pirosecuenciación pueden ser alineados, tales como RDP, SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) y Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) (DeSantis TZ. y col. 2006; Pruesse E. y col. 2007).

Estos paquetes permiten el análisis completo de una muestra, a partir de los datos sin procesar generados por el secuenciador. Pero a pesar de estos avances, todavía existen retos y limitaciones asociadas con la descripción de las comunidades mediante secuencias del gen ARNr 16S ARNr. Una de

las limitaciones más grandes del estudio de un determinado ambiente mediante el análisis del gen ARNr 16S ARNr, es que no aporta ninguna información funcional del nicho a estudio. Es por este motivo que se han llevado a cabo otras aproximaciones metagenómicas. Esta técnica consiste en la extracción directa del ADN total de una comunidad microbiana, obviando así la necesidad de cultivo, e incluso amplificación o clonación, habiéndose aplicado a la descripción de ambientes del cuerpo humano como el intestino humano (Qin J. y col. 2010) o la cavidad oral (Belda-Ferre y col. 2012). Además, en los últimos años se han desarrollado nuevas herramientas moleculares e informáticas que permiten la secuenciación de metagenomas con muy baja cantidad de ADN y su posterior análisis. Se pueden extraer las secuencias del 16S ARNr para el estudio filogenético, y el resto de secuencias se asignan funcionalmente para conocer las funciones codificadas por la comunidad microbiana en un determinado nicho, y cuáles de dichas funciones están sobre-representadas, aportando información sobre la contribución de la microbiota a un determinado ambiente.

La metagenómica proporciona por tanto una valiosa información de la diversidad genética en un ambiente determinado, pero no de cuáles de estas funciones se están realmente expresando. Para tener una visión más completa y robusta de las comunidades microbianas, se deben considerar otros abordajes complementarios que proporcionen evidencia acerca de las funciones expresadas y la actividad de las bacterias. Para ello se han desarrollado otras técnicas como la metatranscriptómica, que consiste en obtener información de los genes expresados de un determinado ambiente mediante la secuenciación del cDNA total de una muestra (Gosalbes y col. 2011). También se puede llevar a cabo el estudio metaproteómico de la muestra, generalmente mediante espectrometría de masas, obteniendo información de las proteínas presentes en un ecosistema, si bien esta estrategia tiene algunos inconvenientes en la extracción, separación e identificación (Wilmes P. y Bond PL. 2006).

En resumen, todo este flujo de información ha posibilitado nuevas metas pero también ha supuesto nuevos retos. El desarrollo de métodos de secuenciación masiva nos ha permitido entrar en una era donde podemos alcanzar, con un limitado esfuerzo económico y de tiempo, un nivel de resolución genética impensable hasta hace pocos años. Pero también ha abierto las puertas al uso de otras tecnologías disponibles que se pueden adaptar a estas nuevas técnicas de secuenciación, lo que amplía de manera considerable tanto el nivel de preguntas que podemos plantear, como las respuestas que se obtengan, siempre y cuando se sepan manejar las enormes necesidades computacionales y estadísticas asociadas a la secuenciación masiva.

1.4. Trabajo de esta tesis.

En la presente tesis se ha tratado de poner en práctica un amplio abanico de tecnologías a nuestro alcance: desde las técnicas de cultivo clásico, pasando por el clonado de ADN ambiental en librerías metagenómicas, o las técnicas de secuenciación masiva aplicadas a productos amplificados o al ADN total, para proceder al estudio de la fracción bacteriana del microbioma humano. La tesis se centra en diferentes ambientes del cuerpo humano, como son la cavidad oral, la leche materna y el aparato respiratorio, prestando especial hincapié a la placa dental.

Primeramente hemos caracterizado la diversidad bacteriana mediante el uso del gen marcador molecular 16S ARNr en nichos pertenecientes al cuerpo humano como la boca, vías respiratorias o la leche materna. Mediante los análisis del gen 16S ARNr se ha pretendido mejorar sustancialmente nuestro conocimiento de las comunidades bacterianas de la cavidad oral (Capítulo 1 y 2), de las vías respiratorias (Capítulo 3) y de la leche materna (calostro y leche madura) (Capítulo 4) en relación al conocimiento disponible hasta la fecha procedente principalmente de la investigación basada en el cultivo o la secuenciación tipo Sanger.

Pero además la tesis se centra en el estudio de la boca en profundidad, estudiando funcionalmente la población bacteriana de la placa dental en los chimpancés mediante metagenómica directa del ADN de este biofilm. Esta información se comparó con la población bacteriana humana, ya que el chimpancé es nuestro ancestro más cercano, a fin de poder observar posibles cambios en la microbiota acontecidos por el cambio de dieta y de hábitos por el ser humano (Capítulo 5). Por último hemos usado librerías metagenómicas en gente con y sin caries para detectar posibles sustancias bioactivas inhibidoras del crecimiento de bacterias cariogénicas (Capítulo 6). Aunque estas nuevas técnicas de clonación de ADN ambiental y secuenciación masiva son extraordinarias para describir el reservorio genético proporcionado por la microbiota de un nicho determinado, las técnicas clásicas de cultivo pueden proporcionar mucha información de especies no aisladas hasta la fecha y estudiar su fisiología. Además, estos aislados pueden suponer una importantísima fuente de probióticos para restablecer el equilibrio ecológico en comunidades microbianas responsables de enfermedades que atacan al ser humano, como se ha propuesto frente a la caries dental (Capítulo 7).

II.

Objetivos

El objetivo general sería la puesta a punto y desarrollo de aproximaciones moleculares, de secuenciación masiva, metagenómicas y bioinformáticas que hagan posible el estudio de las distintas poblaciones bacterianas que forman parte del microbioma humano. En concreto, se persiguen los siguientes objetivos específicos:

1. Uso de técnicas moleculares, de secuenciación masiva y bioinformáticas para la caracterización taxonómica de muestras de origen humano y animal.
2. Uso de técnicas de secuenciación masiva y bioinformáticas para la caracterización funcional de muestras de origen humano y animal.
3. Desarrollo de técnicas metagenómicas para el estudio de muestras microbianas de origen humano y su posible explotación biotecnológica.
4. Desarrollo de un sistema de cribado con dichas librerías metagenómicas para la búsqueda de nuevas sustancias antibacterianas.
5. Aislamiento de bacterias de origen humano con posibles propiedades probióticas.

III. Estudios de diversidad bacteriana mediante el uso del marcador molecular 16S rRNA

III.

Capítulo 1.

El microbioma de la placa dental de humanos y chimpancés

1.1. Introducción

La cavidad oral es un complejo ecosistema con una diversidad bacteriana espectacular (Simmonds RS. y col. 2000). Se calcula que el número total de especies supera las 500 (Paster BJ. y col. 2001). La mayoría de estos organismos son comensales, pero otros son causantes de enfermedades muy comunes, como la caries y las enfermedades periodontales. La cavidad oral contiene diferentes microambientes como las mejillas, el paladar, la lengua, la superficie dental, el área gingival y la saliva, y aunque todas ellas comparten una serie de especies bacterianas comunes, su composición es distinta (Aas AJ. y col. 2005; Simon-Soro A. y col. 2013). La microbiota oral se encuentra principalmente formando biofilms en las superficies de los dientes y de la lengua, por lo que la mayoría de las

enfermedades asociadas a estas zonas corresponden a comunidades bacterianas más que a microorganismos individuales (Jeckinson HF. y Lamont RJ. 2005). El biofilm bacteriano formado en la superficie de los dientes se conoce como placa dental. La placa dental se define como una comunidad microbiana que se encuentra sobre la superficie dental, constituida por el cúmulo de bacterias y productos extracelulares que se adhieren a la película amorfa que hay sobre la superficie limpia del diente, formada principalmente por glucoproteínas salivares.

El biofilm bacteriano se presenta en la boca de individuos sanos y enfermos, y es el agente etiológico de dos de las enfermedades orales más prevalentes: la caries dental y la enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis) (Marsh PD. Y col. 1999). Se ha determinado que las células bacterianas de la biopelícula exhiben características biológicas que difieren marcadamente de las bacterias que están aisladas, o en suspensión (Listgarten MA. y col. 1999; Rudney JD. 2000). La formación del biofilm comienza por cocos y bacilos gram-positivos sobre el área supragingival (en principio aerobia) y sobre la que van apareciendo bacilos gram-negativos anaerobios, que se introducen en el área subgingival. La placa supragingival es principalmente cariogénica y la subgingival periodontopática. Aunque son numerosos los estudios realizados sobre la asociación entre la composición de la microbiota oral y el proceso de la caries dental, la interpretación de los resultados se hace difícil. Si bien los estudios experimentales en animales han demostrado que la habilidad de inducir caries dental no es una propiedad exclusiva de una especie en particular, han dejado claramente establecido que los estreptococos del grupo mutans (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*) están claramente involucrados (Loesche WJ. 1986).

Las enfermedades orales están lejos de ser erradicadas a pesar de su incidencia y consecuencias en términos de dolor, pérdida de dientes o la probabilidad de sufrir algún tipo de infección. El principal motivo es que el estudio de estas enfermedades y su tratamiento es complicado, debido a tres factores: (1) Más de la mitad de las bacterias orales no son cultivables; (2) La boca es un hábitat sumamente complejo (al menos 300-500 especies bacterianas) y lleno de interacciones, en el que la destrucción de ciertas especies podría alterar el equilibrio ecológico; y (3) Existe más de una especie responsable de estas enfermedades (al menos 3 en el caso de la periodontitis). Por tanto, el estudio de dichas enfermedades orales comienza por la identificación de los microorganismos presentes en la placa dental, muchos de los cuales no son cultivables por métodos estándar de cultivo. Por ello, el uso de

herramientas moleculares como la secuenciación de genes conservados que puedan ser utilizados como marcadores taxonómicos proporciona la oportunidad de caracterizar la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral.

La secuenciación del gen 16S ARNr es una de las aproximaciones más utilizadas para estudiar una comunidad microbiana sin necesidad de cultivo (Streit WR. y Schmitz RA. 2004) y su secuenciación masiva ha supuesto un revulsivo en el estudio del microbioma humano. El presente trabajo pretende hacer uso de las técnicas de clonación y de secuenciación masiva para, tras obtener el ADN total de la placa dental, amplificar un gen que pueda servirnos de marcador filogenético (como es el gen 16S ARNr) y estimar la diversidad bacteriana en las muestras. La aproximación que hemos llevado a cabo consiste en la estimación de la diversidad de bacterias en pacientes con caries y en personas que nunca han sufrido esta enfermedad, así como en chimpancés criados en cautividad. Con ello pretendemos obtener un repertorio de las especies bacterianas representativas de la placa dental en condiciones de salud y enfermedad. Para ello hemos clonado y secuenciado el gen 16S ARNr mediante cebadores universales en muestras de placa dental, obteniendo una estimación de la biodiversidad en ambos grupos, además de una segunda aproximación mediante pirosecuenciación directa de los amplicones sin necesidad de clonación.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Obtención de muestras.

Se realizó en primer lugar una búsqueda de voluntarios de entre 20-50 años que hubieran tenido caries en el pasado y voluntarios que nunca hubieran padecido la enfermedad. En el grupo de voluntarios sanos, la ausencia de caries y empastes se confirmó por inspección oral. El uso de antibióticos en los tres meses anteriores a la toma de muestras fue motivo de exclusión.

A los 16 voluntarios seleccionados (6 con caries en el pasado [CA], y 10 voluntarios que nunca han tenido caries [NC]) se les tomó una muestra de placa dental supragingival de al menos 8 dientes por ambas superficies libres, incluyendo incisivos, caninos, premolares y molares mediante el raspado con palillos de madera estériles autoclavados (Keijser BJ. Y col 2008). De la misma forma se obtuvo placa dental de tres chimpancés en cautividad (CH), de 25-35 años, provenientes del refugio de animales El Arca de Noé en Alicante, con la ayuda de los cuidadores del refugio, obteniendo placa dental de al menos 8 dientes por la superficie vestibular. Las muestras se depositaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 500 µl de tampón fosfato y fueron congeladas a -80 °C hasta su uso.

Voluntario	Género	Edad	Presencia de caries	Voluntario	Género	Edad	Presencia de caries
CA101	Hombre	32	Si	NC201	Mujer	23	No
CA102	Hombre	31	Si	NC202	Mujer	29	No
CA103	Mujer	27	Si	NC203	Mujer	50	No
CA104	Hombre	55	Si	NC204	Mujer	80	No
CA105	Hombre	30	Si	NC205	Mujer	42	No
CA106	Hombre	25	Si	NC206	Hombre	22	No
CH01	Chimpancé	25-35	No	NC207	Mujer	23	No
CH02	Chimpancé	25-35	No	NC208	Hombre	22	No
CH03	Chimpancé	25-35	No	NC209	Hombre	25	No
				NC210	Hombre	21	No

Tabla 1. Datos clínicos de los donantes.

1.2.2. Extracción de ADN.

Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min para separar las células y extraer el ADN con el kit de extracción de ADN AquaPure de Biorad, eliminando el ARN por la RNasa A, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ADN, su concentración se midió con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Fisher Scientific), comprobando los valores de la relación 260/280 de absorbancia para evaluar la pureza del ADN.

1.2.3. Amplificación del DNA extraído mediante PCR.

1.2.3.1. Clonación del producto de PCR.

Con el ADN extraído de la placa dental, se procede a la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen ribosómico 16S (ADNr). Se utilizaron los cebadores universales 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 23S-247R (5'-GGGTTTCCCCATTCGGAAATC-3'), que se encuentran en las posiciones 8-27 y 247-227 de los genes 16S y 23S, respectivamente, obteniendo cadenas que oscilan entre los 1800-2500 pares de bases (pb). Ello se debe a que aunque la longitud del gen ribosómico 16S es prácticamente la misma en todas las bacterias, entre los genes 16S y 23S se sitúa el espaciador intergénico (ITS) con una longitud variable, produciéndose así una variabilidad en la longitud de las bandas, que oscilarán entre 1800-2500 pb según el tamaño del ITS.

La PCR se realizó mediante la adición de 1 ul de ADN a una mezcla de reacción (volumen final de 50 ul) que contiene 10 nmol de cada cebador, 40 nmol de dNTPs, y 1 ul de DNA polimerasa (AB-Gene ADN polimerasa, Thermo Scientific). Las siguientes condiciones fueron utilizadas: desnaturalización a 94 ° C durante 1 min, hibridación a 58 ° C durante 30 segundos, y elongación a 72 ° C durante 2 min, seguida de una elongación final, 10 min a 72 ° C tras 22 ciclos de amplificación. El último paso de la PCR debe durar entre 7 y 10 minutos, para que la cola poli-A se complete totalmente, ya que esto es lo que permite su inserción en el vector durante la clonación del producto de PCR,

debido a que los extremos del vector poseen una cola complementaria poli-T. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit de purificación de PCR QiaQuik (QIAGEN).

La clonación se realiza con el producto de PCR purificado, mediante el TOPO TA cloning Kit (Invitrogen), utilizando las células de *E. coli* competentes “top10”, siguiendo las especificaciones del fabricante, con ligeras modificaciones como son el aumento de incubación de 5 a 30 minutos para facilitar la unión entre el vector y el producto de PCR. La entrada del vector a las células se estimuló mediante estrés térmico. Dado que el número de especies bacterianas por individuo supera las 50 (Paster BJ. y col. 2001), decidimos obtener al menos 100 clones del gen 16S rDNA por muestra.

Las células transformadas se sembraron en placas de agar de Luria-Bertani (LB) suplementado con kanamicina (50 mg/ml) más X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) y se incubaron durante la noche a 37 ° C. Se seleccionaron las colonias blancas que son las que deben contener el inserto del gen ribosómico bacteriano (Figura 1.1). La presencia de insertos del tamaño molecular correcto (1,800-2,500 pb) se confirmó mediante amplificación por PCR de las colonias de color blanco con un cebador directo de M13 y un cebador inverso M13 (Invitrogen), seguido por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADN se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit de purificación de PCR QiaQuik (QIAGEN) y se secuenciaron en SECUGEN (Madrid) con el cebador 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3').

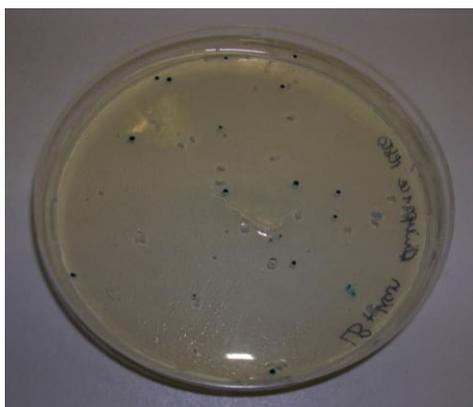


Figura 1.1. Placa de agar con X-gal y kanamicina. Han crecido las bacterias que contienen el vector sin inserto (colonias azules) y con el gen del 16S insertado (colonias blancas, que han sido picadas para su posterior crecimiento y PCR).

1.2.3.2. Pirosecuenciación directa del producto de PCR.

Se realizó la amplificación del gen 16S ARNr mediante cebadores universales modificados, de tal manera que se pueda proceder a su pirosecuenciación directa, separando las muestras mediante “códigos de barras” (McKenna P. y col. 2008). Estos “codigos de barras” lo forman 8 pb incluidos en el cebador, siempre diferenciándose en al menos 2 pb entre ellos, pudiendo asignar a cada voluntario sus secuencias pertinentes (tabla Anexo 1.1). Para la amplificación se escogieron las zonas hipervariables V1 y V2, pues son las que cuentan con mayor número de secuencias en las bases de datos y porque nuestras propias simulaciones indican que la asignación taxonómica en esta región es más fiable, eligiendo para esta amplificación los cebadores universales 8-27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 533R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCACG-3'). Estos cebadores estaban modificados para incluir los adaptadores A (para los cebadores directos) y B (para el cebador reverso) del pirosecuenciador 454 FLX (Roche) (Figura 1.2). La librería de amplicones se realizó para cada muestra de ADN individualmente (16 humanos y 3 chimpancés). La PCR se realizó con la polimerasa de alta fidelidad de ABgene (Thermo Scientific) realizando tan sólo 20 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización (94 °C, 10 segundos), hibridación (52 °C, 30 segundos), y extensión (68 °C, 120 segundos) a fin de minimizar los sesgos de PCR (Sipos y col. 2007), acabando con una extensión final de 7 minutos a 68°C, realizándose 5 PCRs por cada muestra, que se combinaron antes de su purificación. La amplificación del ADN del tamaño correcto se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, purificando el producto de PCR con el QIAquick PCR purification kit de Qiagen, para su posterior pirosecuenciación.

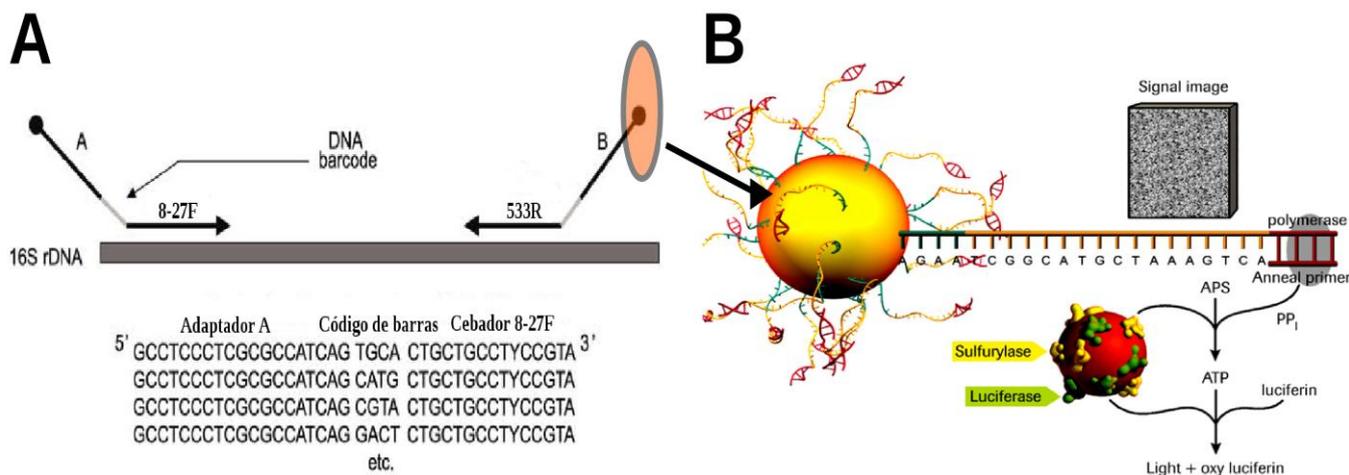


Figura 1.2. Cebadores con sus adaptadores y “códigos de barras” (“DNA Barcode”) y posterior pirosecuenciación. La imagen A muestra el cebador inicial del gen ribosómico 16S (8F), unidos a 4 pb que funcionan a modo de “código de barras” (barcode) más el adaptador A (lugar de iniciación de la pirosecuenciación), y el cebador reverse 533R más el adaptador B (el cual se une a la microesfera donde se lleva a cabo la PCR en emulsión). La imagen B muestra la reacción que tiene lugar en el proceso de pirosecuenciación al añadir un nuevo nucleótido a la cadena molde: la molécula de pirofosfato que se genera es transformada en luz, la cual es leída por una cámara ultrasensible que va generando la secuencia de ADN.

El ADN amplificado por muestra se midió por un espectrofotómetro NanoDrop 1000 y 12 muestras se mezclaron en cantidades equimolares. Cada grupo de 12 muestras se purificó adicionalmente y se concentró mediante el uso de filtros Microcon (Millipore) en un volumen final de 20 μ l y una concentración mayor que 100 μ g/ μ l, medido por picogreen en un fluorímetro Modulus® (Ref. 9200-001). Los productos de PCR fueron secuenciados unidireccionalmente a partir del adaptador B por el sistema FLX en la empresa Life Sequencing (Valencia).

1.2.4. Identificación taxonómica de bacterias.

En el caso de las secuencias obtenidas mediante clonación, se requiere la evaluación de los electroferogramas de dichas secuencias. Se realizó de forma manual mediante el software Sequencher (GeneCodes). Las quimeras se eliminaron mediante el programa Bellerophon (Huber T. y col. 2004).

En el caso de las secuencias obtenidas mediante pirosecuenciación, las lecturas con un valor promedio de calidad inferior a 20 y/o con más de 4 ambigüedades en las regiones homopoliméricas en

los primeros 360 flujos fueron excluidas del análisis. Sólo las lecturas de más de 200 pb fueron consideradas, y las secuencias quiméricas fueron filtradas utilizando el software Bellerophon (Huber T. y col. 2004). Las secuencias obtenidas por pirosecuenciación se asignan a cada muestra por el código de barras que contenía cada cebador mediante una herramienta para tal fin, incluida en la base de datos Ribosomal Database Project (RDP; Cole JR. y col. 2009).

Las secuencias obtenidas por pirosecuenciación y clonación se analizan utilizando el clasificador de la RDP, donde se asignó cada lectura a un phylum, clase, familia y género, siempre y cuando la asignación taxonómica fuera inequívoca dentro de un umbral de confianza del 80%. También se procedió a medir si las comunidades microbianas en diferentes tipos de muestras eran significativamente diferentes por grupos, en concreto humanos que no han tenido caries, humanos que han tenido caries en el pasado y chimpancés, mediante Análisis de Coordenadas Principales (Principal Coordinates Analysis, PCoA), para mostrar si la composición de especies presentaba diferencias entre dichos grupos. Para ello se utilizó el programa Unifrac (Lozupone C. y col. 2006), especialmente diseñado para describir y comparar comunidades microbianas en base a secuenciación masiva de genes marcadores filogenéticos.

Las curvas de rarefacción estiman el número de especies esperadas en una muestra tomada al azar. Mediante los datos tomados de un censo o colección de datos y a partir del número de individuos de cada especie, se calcula cuántas especies se esperan en una muestra de n individuos (James FC. y Rathbun S. 1981). La rarefacción compara la diversidad observada entre sitios, tratamientos o hábitats que no han sido muestreados equitativamente y permite saber si el esfuerzo de muestreo (en nuestro caso el número de secuencias del 16S obtenidas) es suficiente para describir el ecosistema. Por tanto, esta técnica calcula el número de especies esperadas, incluso en caso de que todas las muestras no posean el mismo número de secuencias. Sin embargo, presenta algunos sesgos debido a que algunas especies pueden ser más propicias a ser observadas que otras (Gotelli NJ. y Colwell RK. 2001). La construcción de curvas de rarefacción puede ser vista como un proceso de extrapolación, que hipotéticamente nos daría la riqueza verdadera del ecosistema (Gotelli NJ. y col. 2005). Para estimar la diversidad total de cada muestra, las secuencias se agruparon en identidad de nucleótidos al 97% a lo largo de más del 90% de longitud de la secuencia alineada utilizando el software CD-HIT (Li W. y Godzik A. 2006) y las curvas de rarefacción se obtuvieron mediante el programa aRarefactWin (Steven

M. Holland, 2003). Para este análisis, las secuencias de más del 97% de similitud se consideraron que correspondían a la misma unidad taxonómica operacional (OTU), que representa un grupo de lecturas que probablemente pertenecen a la misma especie (Sogin M. y col. 2006).

1.3. Resultados y Discusión

Tras el filtrado de calidad y longitud, se obtuvieron un promedio de 440 secuencias por muestra, de 16 humanos y 3 chimpancés, con una longitud media de 252 pares de bases en las secuencias obtenidas por pirosecuenciación. Por clonación obtuvimos un promedio de 106 secuencias por muestra, de dos humanos y un chimpancé, con una longitud media de 384 pares de bases.

1.3.1. Determinación de la biodiversidad oral mediante clonación y pirosecuenciación.

En tres de las muestras (CA-1001, CH-002, y NC-2002) se pudieron obtener resultados de composición bacteriana mediante dos métodos diferentes: pirosecuenciación directa de los productos de PCR (16S-pyro) y clonación del gen 16S rDNA amplificado (16S-clon) (Figura 1.3). Debido a la diferencia en el número de lecturas entre los dos métodos, el número de OTUs detectado por pirosecuenciación fue significativamente superior al que se obtuvo por clonación. Aunque algunos de los grupos taxonómicos muestran proporciones similares, los resultados obtenidos son diferentes en los dos métodos. Si bien parte de estas incongruencias se deben a las diferencias en el esfuerzo de muestreo (un orden de magnitud superior por pirosecuenciación), gran parte de las diferencias vienen producidas por los sesgos de cada metodología, observando a nivel de familia que cada método tiene una mayor o menor afinidad para distintos grupos bacterianos. El sesgo de la PCR es común en ambos: los cebadores “universales” no amplifican por igual todos los grupos taxonómicos debido a las diferencias en la secuencia complementaria a los cebadores, demostrándose que el uso de distintos cebadores sobre la misma muestra proporciona estimaciones distintas de la composición microbiana (de Lillo A. y col. 2006). La primera aproximación tiene además el sesgo asociado a la clonación, debido a los efectos

tóxicos de ciertos genes en el hospedador (en este caso *E. coli*) que pueden impedir o dificultar la clonación de los genes de determinadas especies (Sorek R. y col. 2007; Ghai R. y col. 2010). En cuanto a la pirosecuenciación de productos de PCR, es posible que el uso de cebadores de gran longitud al contener los adaptadores y el código de barras, pueda interferir positiva o negativamente con la amplificación de algunos grupos taxonómicos. Este riesgo se intentó reducir con la incorporación de dos nucleótidos a modo de “separador” o linker entre el cebador de amplificación y el adaptador, consistente en dos pares de bases que nunca se encuentran en esa posición en los genes del 16S conocidos.

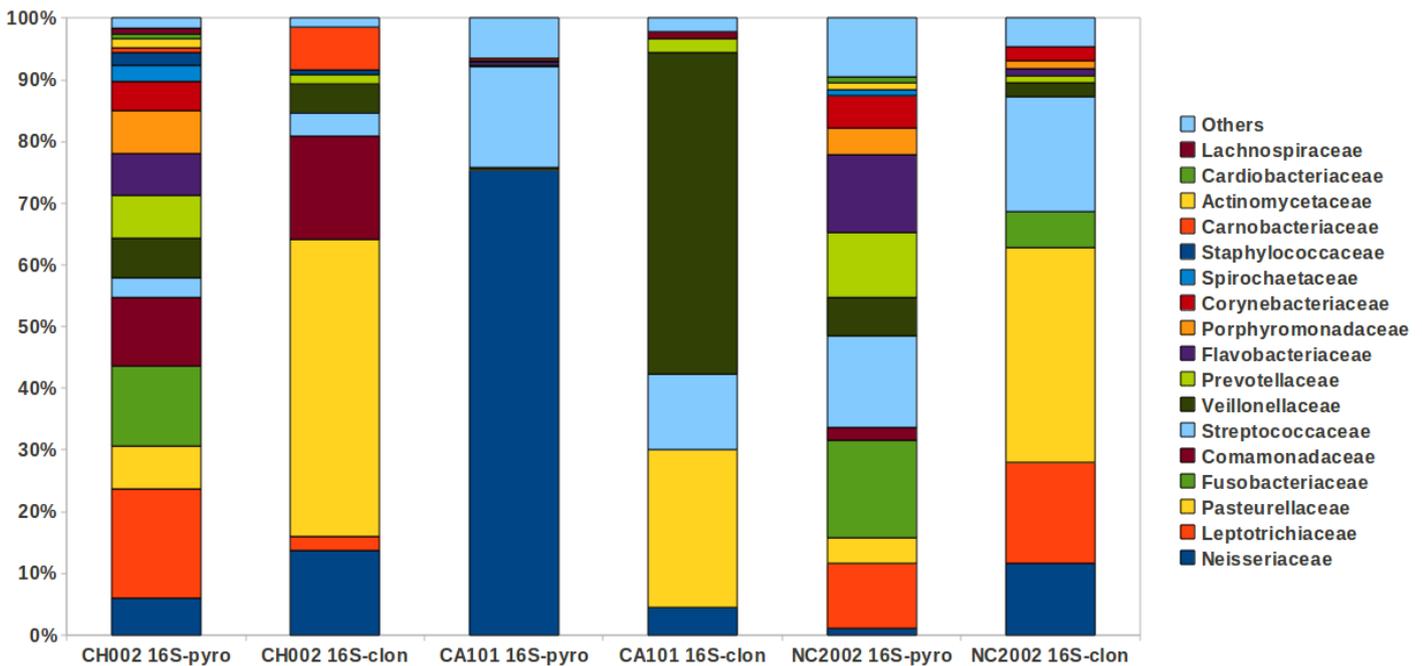


Figura 1.3. Asignación taxonómica mediante PCR del gen 16S ARNr. Porcentaje de secuencias del gen 16S asignadas a cada familia bacteriana mediante clonación (“16S-clon”) y pirosecuenciación (“16S-pyro”) del producto de PCR amplificado en muestras de placa dental de chimpancé (CH002) y humana (Ca101 y NC002).

En cuanto a los aspectos metodológicos, el método de la pirosecuenciación mediante código de barras permite una secuenciación más barata y rápida, obteniendo un mayor número de secuencias en un corto espacio de tiempo para estimar la diversidad biológica de cualquier nicho en comparación con la clonación, disminuyendo el sesgo de muestreo. Otro aspecto que hay que tener en cuenta es la sobrestimación de la diversidad usando métodos de PCR basados en DNA, ya que se pueden amplificar las especies que no son parte de la microbiota oral en activo. Estas especies pueden ser ingeridas con los alimentos y formar parte de una diversidad transitoria pero no miembro activo de la comunidad microbiana. Una posible solución a esta sobrestimación de las especies pasaría por basar nuestros

estudios en muestras de ARN, para detectar las bacterias que forman parte preferentemente activa de la biopelícula oral, y minimizar la amplificación de especies transitorias o contaminantes que no contribuyen al ecosistema.

1.3.2. Número de especies esperadas

Uno de los objetivos de esta investigación es estimar la biodiversidad bacteriana del nicho oral. Para ello, se ha calculado el número de OTUs (unidades taxonómicas operacionales), al 3% de divergencia entre todas las secuencias obtenidas del gen 16S, mostrando el número estimado de posibles especies en dicho ambiente, ya que este grado de divergencia se considera el umbral que separa secuencias pertenecientes a especies distintas (Yarza P. y col. 2008). Posteriormente se relacionó el número de OTUs con el número de secuencias analizadas por pirosecuenciación del gen 16S (es decir la diversidad estimada con el esfuerzo de secuenciación) en muestras de placa dental humana (n=16). Las curvas muestran que, a pesar del alto número de secuencias obtenidas, estamos todavía lejos de la saturación. Por lo tanto, las 440 secuencias obtenidas de promedio, por muestra, son representativas de las especies más comunes, pero dista de describir la diversidad bacteriana total en estas muestras. Los datos sugieren que la placa dental humana se compone de más de 600 especies diferentes, como se había propuesto anteriormente en extrapolaciones basadas en cultivo y clonación del gen 16S (Paster BJ. y col. 2001). Dado que las muestras analizadas son únicamente de placa dental supragingival, y debido a la enorme variabilidad detectada entre diferentes ecosistemas de la boca, como en el surco gingival, los dientes, la lengua o la saliva (Simón-Soro y col. 2013), la diversidad bacteriana en todo el ecosistema oral debe ser todavía superior.

Para poder comparar estas muestras humanas con las de chimpancés (n=3), se tomaron las secuencias de tres voluntarios al azar y se obtuvieron curvas de rarefacción para estos tipos de muestra, repitiéndose este proceso tres veces, calculando la media de las tres rarefacciones (Figura 1.4). Se puede observar que los chimpancés tienen un mayor número de OTUs en la microbiota bacteriana oral que los humanos, indicando que poseen una mayor diversidad. La misma conclusión se obtuvo a partir de los datos de secuenciación metagenómica directa (Capítulo 5).

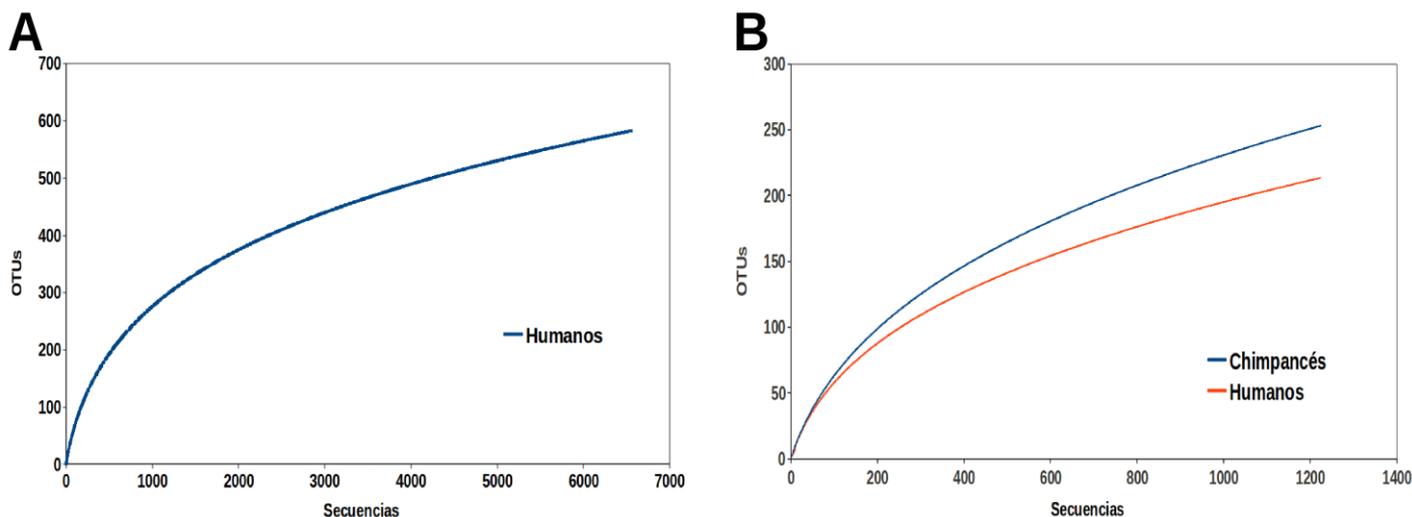


Figura 1.4. Número de OTUs en relación al número de secuencias del gen 16S analizadas mediante pirosecuenciación. A. Muestras de placa dental humana (n=16). B. Comparación entre humanos (n=3) y chimpancés (n=3). Un OTU es una secuencia con más de un 3% de divergencia sobre el resto de secuencias, siendo el 3% el umbral consenso entre genes del 16S de especies distintas.

1.3.3. Composición bacteriana de la placa dental supragingival

La biodiversidad en la placa dental es muy rica, apareciendo a nivel de phylum cuatro grandes grupos, que formarían la microbiota predominante, como son las Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias, existiendo además otros grupos minoritarios como los TM7 o las Espiroquetas (Figura 1.5). Se observa que no todos los taxones son comunes entre los distintos individuos, y que éstos varían en las proporciones relativas. La variabilidad entre individuos aumenta conforme se baja el nivel taxonómico, tal como se puede observar en la distribución taxonómica de familias entre los 16 individuos (Figura 1.6). Además la composición bacteriana en individuos con caries y sin caries muestra algunas diferencias, (Figura 1.7), pues aunque ambos grupos comparten 56 géneros, 43 son exclusivos de individuos con caries y 44 de individuos sin caries.

Así pues, se observa que la microbiota oral humana es personalizada para cada individuo, ya que los grupos comunes son poco frecuentes, mientras que aquellos que son únicos de cada voluntario son mayores en número. La posible agrupación de comunidades microbianas en individuos con y sin caries hace pensar en una combinación de especies comensales inocuas que pueda formar un ecosistema

estable y que a la vez dificulte la instalación de bacterias patógenas (Alcaraz LD. y col. 2012; Zaura E. y col. 2009). Otro de los aspectos que habrá que contrastar es la relación entre estas bacterias y otras enfermedades orales. Por ejemplo, algunos generos solamente hallados en personas sin caries como *Atopobium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas* y *Treponema* se han encontrado con cierta frecuencia en lesiones de periodontitis y gingivitis (Paster BJ. y col. 2001), abriendo la posibilidad de que la ausencia de caries pueda pagarse con una mayor incidencia de enfermedad periodontal a una edad más avanzada. Sin embargo, debido a la corta longitud de los amplicones, las secuencias no se pueden asignar de forma fiable a nivel de especie, por lo que en el futuro habría que determinar si se trata de especies patógenas o comensales pertenecientes a dichos géneros. También sería deseable, para saber si la diversidad encontrada es representativa, analizar la estabilidad temporal de la microbiota oral (ver capítulo 2).

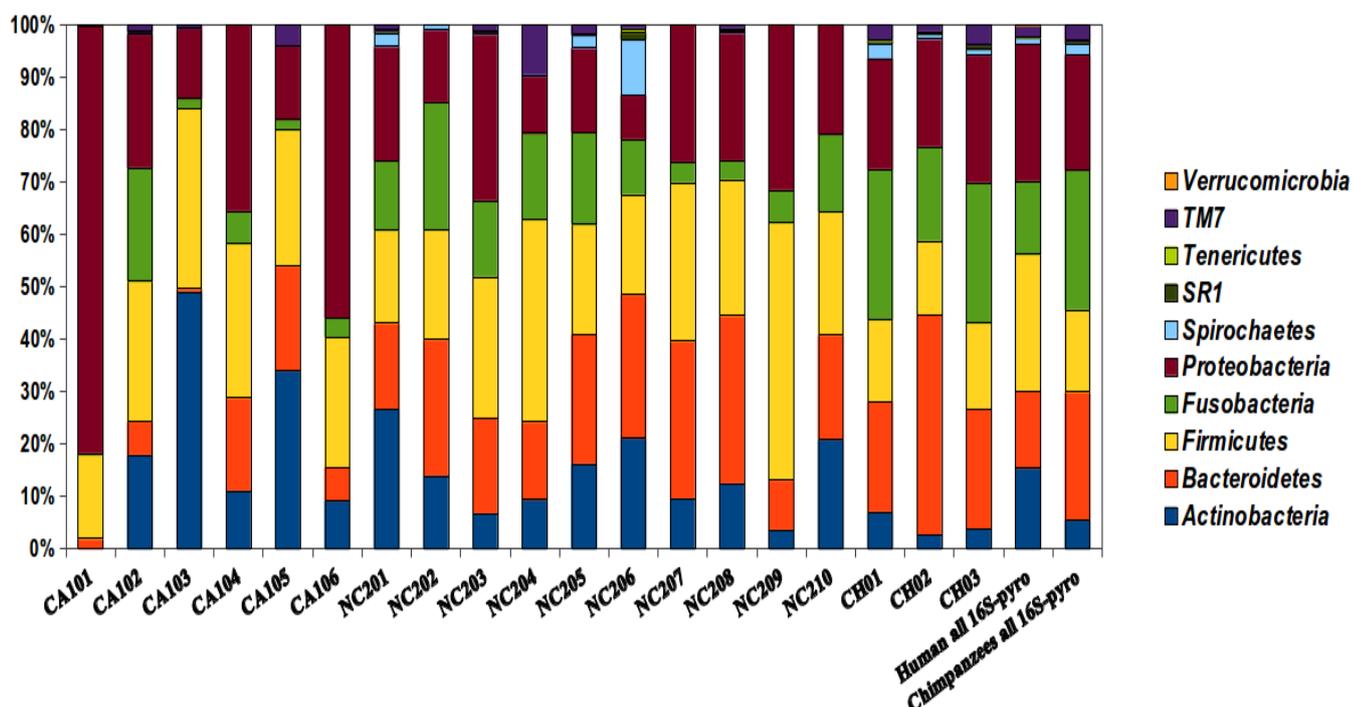


Figura 1.5. Composición bacteriana de la placa dental humana y del chimpancé. Las barras muestran el porcentaje de secuencias del gen 16S asignadas a cada phylum bacteriano mediante pirosecuenciación del producto de PCR amplificado en cada uno de los 16 individuos muestreados y los tres chimpancés criados en cautividad. Los códigos CA y NC corresponden a individuos con caries activas y que nunca han padecido caries, respectivamente.

Cuando se muestra la microbiota oral de cada voluntario a nivel taxonómico de familia (Figura 1.6), los datos indican que la microbiota bucal es muy diferente en cada muestra, y algunos individuos muestran un tipo dominante de bacterias. En chimpancés, las muestras arrojan valores similares de

composición. Los chimpancés muestreados son animales nacidos y criados en cautividad, convivían en la misma jaula, y eran alimentados con la misma dieta, siendo probablemente éstos los motivos por los que presentan una diversidad bacteriana tan similar.

Las cinco últimas (Figura 1.6) corresponden a las muestras individuales y combinadas de los 3 chimpancés y a la media obtenida en las muestras humanas. Al observar las asignaciones taxonómicas a nivel de phylum y familia en las figuras 5 y 6 se percibe una mayor diversidad de la microbiota oral en los chimpancés (77 géneros encontrados en chimpancés frente a los 55 encontrados en humanos, a pesar de tener menor número de individuos y por lo tanto menos secuencias), observando además un menor grado de dominancia, con una proporción similar en cuanto a la presencia de cada uno de los géneros. Esto queda reflejado en un mayor índice de Shannon (diversidad) y de Chao (riqueza) en las muestras de chimpancé (Figura 1.8).

Por tanto, a pesar de que la microbiota de los animales muestreados pueda estar influenciada por los contaminantes como consecuencia de la interacción con los seres humanos y estar en un ecosistema que no es natural, la diversidad es muy alta, detectando un alto número de géneros que no se encuentra en muestras humanas. Esto sugiere que la diversidad en los antepasados humanos fue mayor que en la actualidad, y que puede haber caído debido a los cambios en la dieta, el uso de azúcares refinados, el consumo de antibióticos y los hábitos de higiene dental, entre otros.

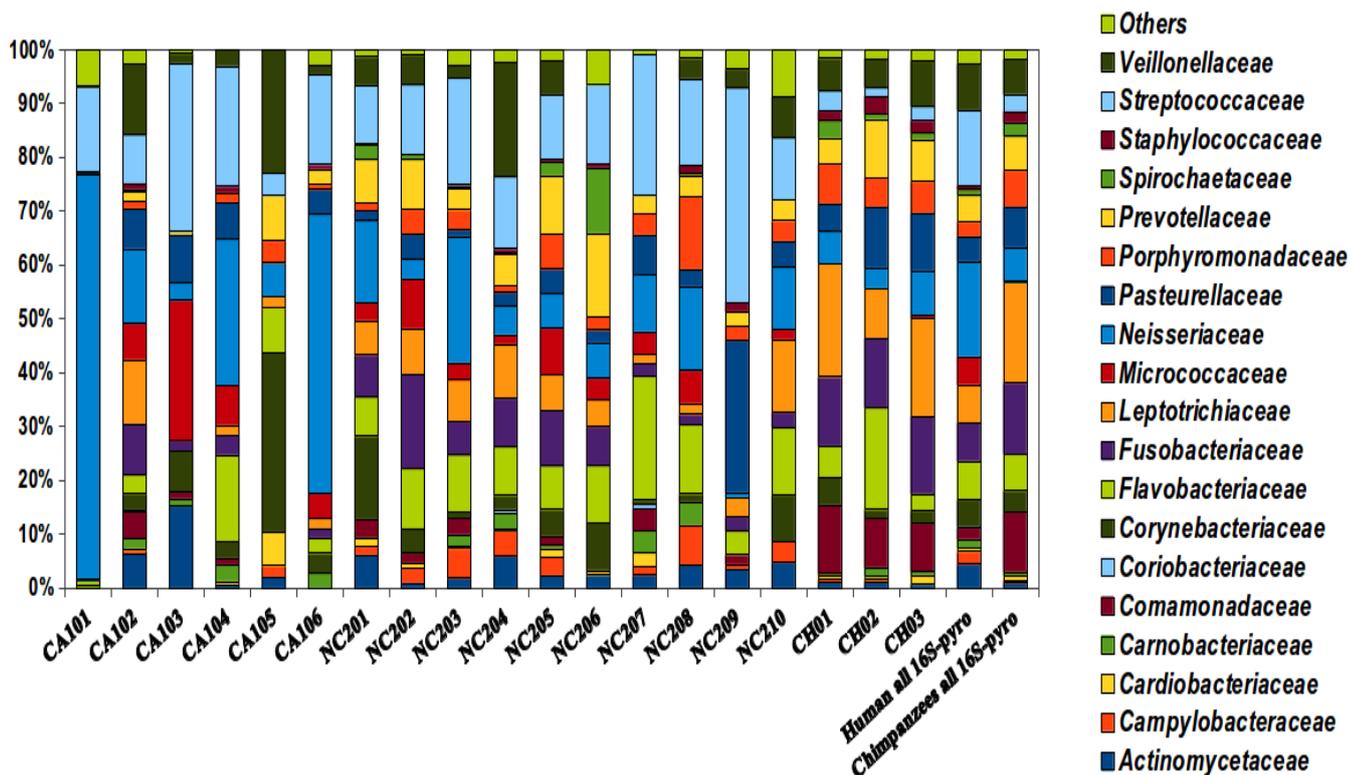


Figura 1.6. Composición de familias bacterianas de la placa dental humana y del chimpancé. Las barras muestran el porcentaje de secuencias del gen 16S asignadas a nivel taxonómico de familia mediante pirosecuenciación del producto de PCR amplificado en cada uno de los 16 individuos muestreados y en las 3 muestras de chimpancé (CH01, 02 y 03). Los códigos CA y NC corresponden a individuos con caries activas y que nunca han padecido caries, respectivamente.

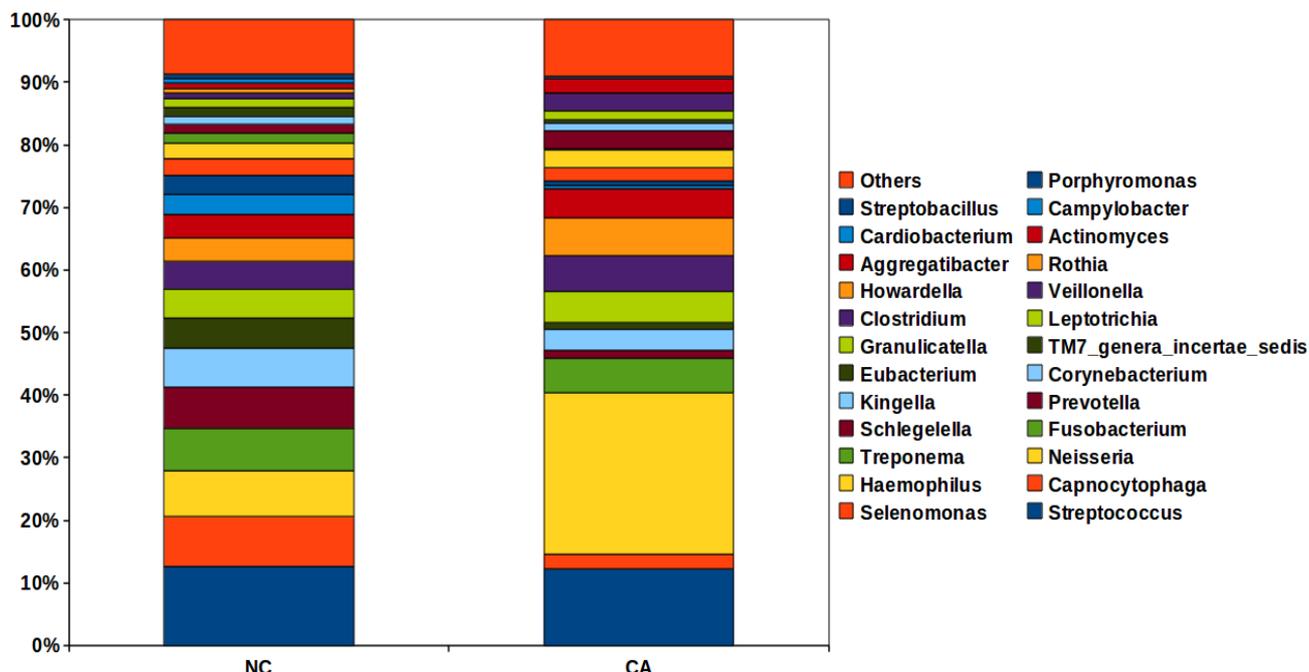


Figura 1.7. Composición bacteriana de la placa dental humana, en individuos con caries activas (CA) y que nunca han padecido caries (NC). Las barras muestran el porcentaje de secuencias del gen 16S asignadas a nivel taxonómico de género mediante pirosecuenciación del producto de PCR amplificado de cada grupo.

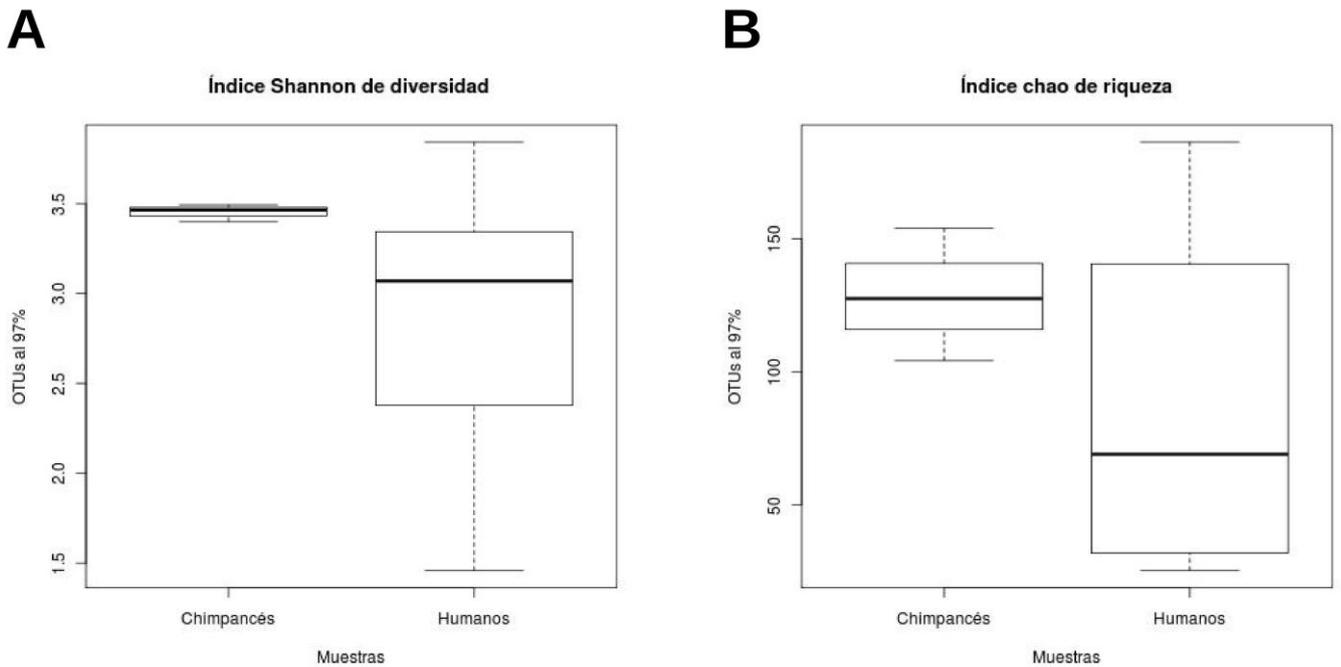


Figura 1.8. Valores estadísticos de los índices Shannon y Chao por grupos de humanos (n=16) y chimpancés (n=3).

1.3.4. Estudios de PCA

El análisis de componentes principales muestra que los dos componentes mayoritarios explican la variación de los datos en un 29,15 y 11,3% respectivamente (Figura 1.9). A partir de esta dispersión, podemos ver que las muestras de los chimpancés están más estrechamente relacionadas entre sí, y también que están bien diferenciadas de las muestras humanas. Lo primero puede estar influenciado en gran medida por factores externos, ya que estos tres chimpancés viven en el mismo ambiente, y alimentados con la misma dieta. La diferenciación de su composición respecto a las muestras humanas, así como su mayor diversidad obtenida mediante las curvas de rarefacción (Figura 1.4.) (a pesar de vivir en cautiverio y en contacto con los seres humanos) hace muy interesante el estudio de la microbiota bucal de nuestros antepasados más cercanos, pues se conoce que no padecen caries en libertad, y podrían por tanto contener especies bacterianas que los seres humanos han perdido y que podrían contribuir a un ecosistema oral saludable.

Respecto a los individuos con y sin caries, aunque no completa, existe una tendencia para la mayor parte de las muestras de individuos sin caries de agruparse en valores positivos del componente

principal al igual que los chimpancés, mientras que los individuos con caries en su mayoría se sitúan en valores negativos (Figure 1.9). Ello hace sospechar la existencia de una microbiota bacteriana asociada a pacientes sanos, tal como ha sido propuesto por Belda-Ferre P. y col. 2012, Alcaraz LD. y col. 2012, y Zaura E. y col. 2009, haciendo deseable el estudio por este procedimiento de un mayor número de muestras para abordar si estas diferencias son significativas.

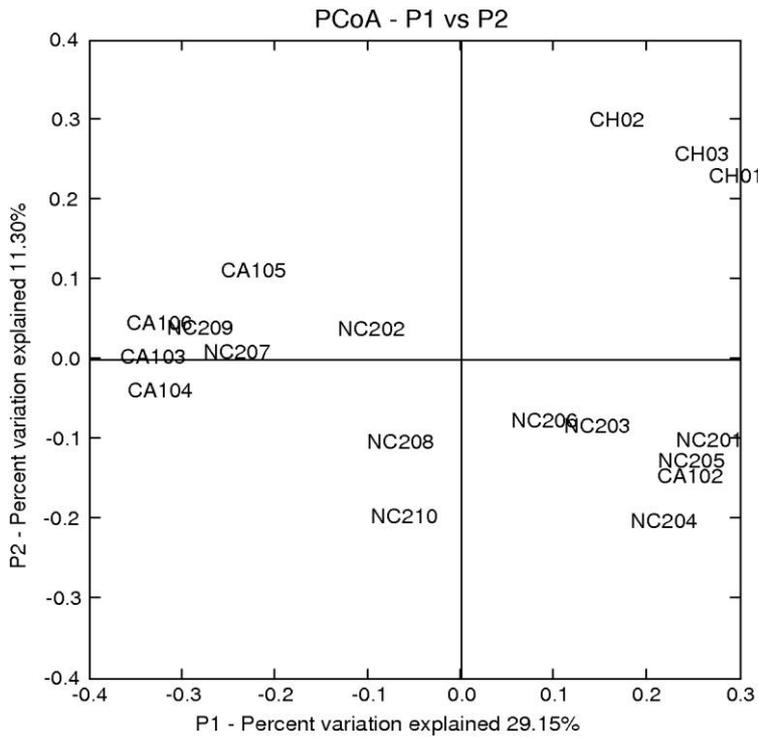


Figura 1.9. Análisis de Componentes principales de las 16 muestras humanas y de las 3 muestras de los chimpancés (CH). Las muestras humanas proceden de individuos con caries en el pasado (CA) y que nunca han padecido caries (NC). Este análisis se realiza en base a la composición bacteriana estimada por las secuencias del gen 16S ARNr.

1.3.5. Estudios comparativos a nivel de género

La Figura 1.10 muestra los géneros bacterianos compartidos entre los humanos y chimpancés, así como las bacterias únicas de cada uno de estos organismos. Se observan 27 géneros específicos de chimpancés (*Alkalibacter*; *Anaerotruncus*; *Aquifex*; *Arcicella*; *Bacillaceae1*; *Caldilineacea*; *Desulfobacca*; *Desulfocella*; *Desulfofustis*; *Dysgonomonas*; *Empedobacter*; *Erythromicrobium*; *Hallella*; *Kordia*; *Methanopyrus*; *Parasporobacterium*; *Peptococcaceae1*; *Polyangiaceae*; *Proteiniphilum*; *Sandarakinotalea*; *Schlegelella*; *Sebaldella*; *Sporacetigenium*; *Sporobacterium*; *Succinimonas*; *Erysipelotrichaceae Incertae Sedis* y *Thermocladium*) no

detectados en las muestras humanas. En cambio en humanos solamente se detectaron tres géneros específicos (*Balneola*; *Scardovia* ; y *Johnsonella*). Dada la ausencia de caries en estos primates en libertad, el estudio de estas bacterias únicas puede tener interesantes implicaciones para entender el desarrollo de la enfermedad. Se incluyen por comparación los géneros bacterianos compartidos y únicos entre humanos, chimpancés y perros (Dewhirst FE. y col. 2012), otra especie animal donde la incidencia de caries es mínima, si bien se usa como modelo de enfermedad periodontal (Weinberg MA. y Bral M. 1999) y para proporcionar apoyo en el diagnóstico y terapia adecuada contra patógenos orales (Braga J. y col. 2005).

Se observa una gran diversidad de géneros específicos en perros, con una mayor biodiversidad que los humanos y chimpancés, y una mayor similitud entre humanos y chimpancés (Figura 1.10). En el caso de los chimpancés, los datos apuntan a una gran diversidad de especies a pesar de tratarse de muestras de animales en cautividad y del menor número de animales muestreados. Por tanto, aunque la microbiota presente puede estar influenciada por contaminantes bacterianos procedentes de la interacción con seres humanos y por estar en un ecosistema que no es el natural, la diversidad es notoriamente superior a la humana (Figuras 1.4, 1.10 y la figura 5.1), conteniendo un alto número de géneros no encontrados en las muestras de nuestra especie. reflejado en los valores de los índices de Chao y Shannon (Figura 1.8). Ello hace pensar que la diversidad en los ancestros humanos fuera mayor que la actual, y que ésta puede haber bajado debido al cambio de dieta, al uso de azúcares refinados y a la incorporación de hábitos de higiene dental con la consecuente falta de exposición a gérmenes, uso indiscriminado de antibióticos y la excesiva asepsia y esterilidad, lo cual se ha propuesto que puede tener consecuencias para la salud humana, desde facilitar la invasión de especies patógenas al aumento de enfermedades del sistema inmune (Guarner F. y col. 2006; Vercelli D. 2006; Brown EM. Y col. 2013).

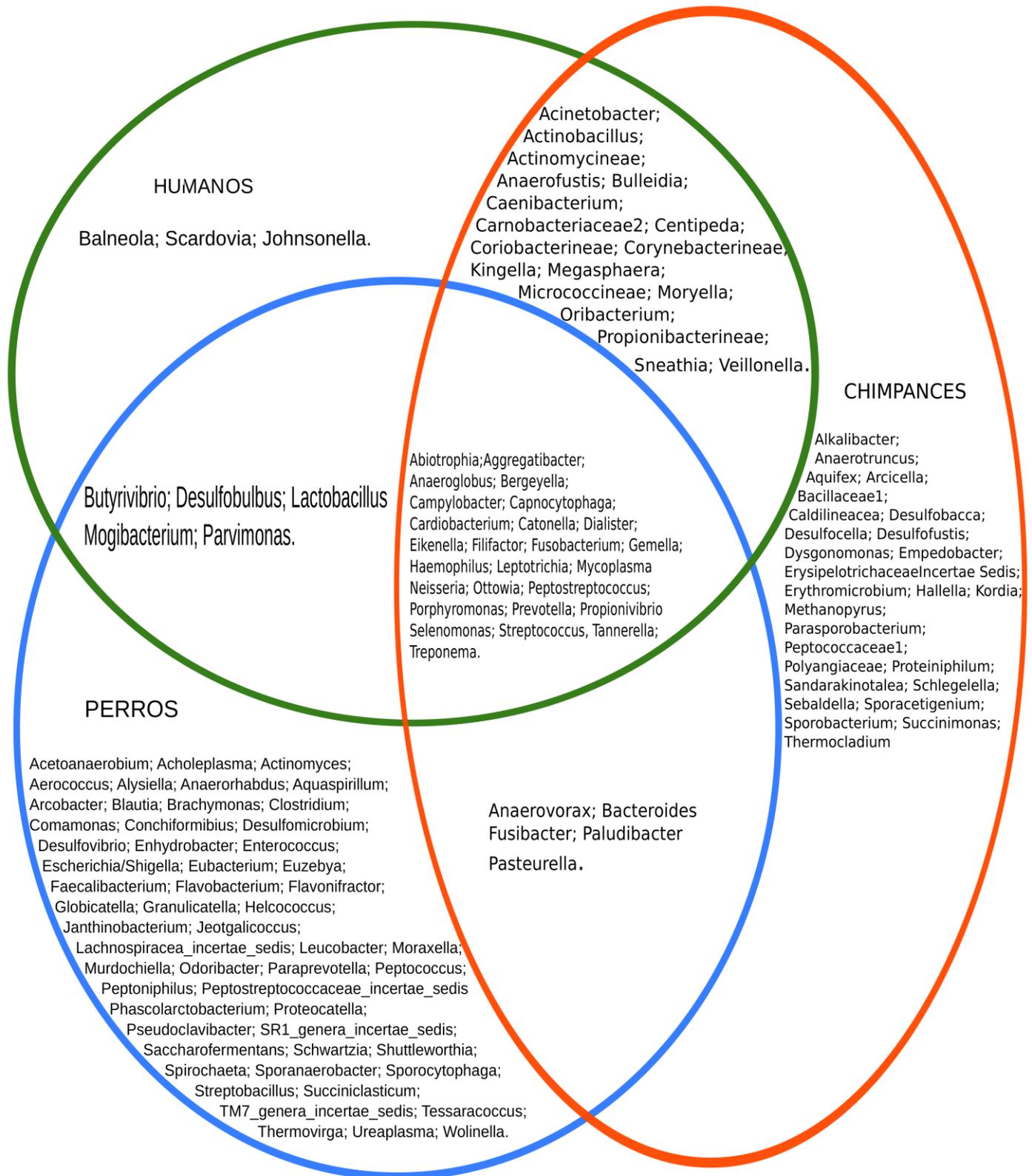


Figura 1.10. Géneros bacterianos compartidos y únicos entre humanos y chimpancés, en base a la composición bacteriana estimada por las secuencias del gen 16S ARNr por pirosecuenciación. Por comparación, se incluyen también los géneros detectados en la cavidad oral canina en base a clonación y secuenciación Sanger del gen 16S (Dewhirst FE. y col. 2012).

III.

Capítulo 2.

Variación temporal del microbioma oral

2.1 Introducción

Con la llegada de la nueva generación de técnicas de secuenciación masiva (NGS por sus siglas en inglés: Next Generation Sequencing) y su uso en el estudio de ambientes microbianos mediante aproximaciones no dependientes de cultivo, se ha revitalizado la investigación sobre el microbioma humano (Turnbaugh PJ. y col. 2007, Dethlefsen L. y col. 2007), incluyendo la cavidad oral (Zaura E. y col. 2009, Belda-Ferre P. y col. 2012). Es necesario describir la composición de la microbiota humana y su función para la comprensión del metabolismo humano, el desarrollo del sistema inmune y la susceptibilidad a ciertas enfermedades, entre otras (Klaasen LLBM y col. 1993; Stecher B. y Hardt WD. 2008). El estudio de las bacterias que habitan en la cavidad oral y el tracto gastro-intestinal se ha visto obstaculizada por la baja proporción de especies que se pueden cultivar mediante técnicas dependientes de cultivo (Suau A. y col. 1999). Las técnicas de cultivo tradicionales y las observaciones por microscopía establecieron que la microbiota que habita en los diferentes nichos dentro de la boca, como los dientes, la lengua o el surco subgingival contienen diferentes conjuntos de especies bacterianas (Wilson y col. 2005; Simon-Soro A. y col. 2013). La placa dental supragingival, por ejemplo, parecía estar formada principalmente por bacterias Gram-positivas, principalmente cocos acidófilos, mientras que en la placa subgingival se encontró principalmente bacilos Gram-negativos en condiciones anaerobias y con un ambiente más alcalino. Estas importantes diferencias entre los tejidos orales se han confirmado recientemente por técnicas moleculares que implican la amplificación del gen ribosómico 16S ARNr en diferentes lugares en la boca. La aplicación de la amplificación por reacción en cadena de

la polimerasa (PCR) y la clonación subsiguiente del gen 16S ARNr en la placa subgingival y supragingival reveló una gran diversidad del ecosistema de cientos de especies (Aas JA. y col. 2005, Hutter G. y col. 2003, Bik EM. y col. 2010), con phyla (como el TM7 o el OP11) no detectados previamente en la boca y sin ningún miembro cultivado hasta la fecha.

Un desequilibrio en la composición de la comunidad bacteriana de la placa subgingival puede dar lugar a gingivitis o enfermedad periodontal, mientras que este desequilibrio ecológico en la placa supragingival podría causar caries dental (Marsh PD. y col. 2010). Por lo tanto, las comparaciones en la composición taxonómica bacteriana entre las muestras de individuos sanos y enfermos han sido un enfoque obvio para determinar microorganismos potencialmente patógenos relacionados con el desarrollo de enfermedades orales (Paster BJ. y col. 2001, Alcaraz LD. y col. 2012). Sin embargo, prácticamente todos los estudios realizados hasta la fecha por las técnicas moleculares se basan en muestras tomadas en un punto de tiempo único tanto en la saliva o en placa dental, proporcionando una escasa información acerca de la variación intraindividual a través del tiempo. En un reciente estudio, se tomaron muestras de lengua de dos individuos por un período de un año, y su diversidad bacteriana se determinó por pirosecuenciación (Caporaso JG. y col. 2011). Se concluyó que la microbiota de la lengua era claramente distinguible de la de otras partes del cuerpo de un mismo individuo, tales como el intestino o la piel. Sin embargo, se observó una gran variación dentro de estas muestras orales, ya que sólo el 10% de las especies permanecía estable a lo largo del tiempo, denominándose esta fracción como "microbioma núcleo". Se planteó que la exposición a los alimentos, viajes, medicación o los cambios de la respuesta inmune, entre otros, podrían dar lugar a cambios en la composición bacteriana, entre ellos la proliferación o reducción de ciertos taxones que se observó con frecuencia (Caporaso JG. y col. 2011). Por lo tanto, la definición de la microbiota de un individuo sobre la base de los resultados obtenidos a partir de una sola muestra puede no ser representativa y estará influenciada por la presencia relativa de la comunidad bacteriana transitoria.

Por este motivo se hace necesario investigar la diversidad y composición de la microbiota a lo largo del tiempo, pues la misma estrategia de comparación entre muestras de pacientes sanos y enfermos se ha llevado a cabo para estudiar la etiología y/o identificar biomarcadores de muchas enfermedades, desde el cáncer colorectal (Chen W. y col. 2012.) a distintas afecciones inflamatorias intestinales (Durban A . y col. 2012). En este capítulo, se ha estudiado la diversidad bacteriana en la placa dental supragingival mediante amplificación por PCR del gen 16S ARNr y posterior pirosecuenciación en 10 donantes adultos de diferentes características (hábitos de edad, dieta, salud e higiene oral) durante un período de cuatro meses. El objetivo es estudiar la variabilidad en la placa

dental de las comunidades bacterianas a través del tiempo con el fin de evaluar la estabilidad de la microbiota oral para probar la existencia de una comunidad microbiana núcleo. La estimación de la variabilidad determinará si la composición bacteriana a través del tiempo sigue siendo distinguible entre los individuos y ayudará a diseñar estrategias de muestreo para estudiar los cambios de las comunidades microbianas en condiciones de salud y enfermedad.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1. Obtención de muestras y extracción de ADN.

Se seleccionaron 10 voluntarios, mujeres comprendidas entre 20-50 años de edad, que acudieron entre junio y septiembre de 2010 a la clínica dental “Dental Clinic” de Valencia, de acuerdo con la voluntad del paciente a ser monitorizados regularmente durante 4 meses consecutivos. Los criterios de exclusión fueron que no hubiese sido sometido a terapia con antibióticos en los últimos 3 meses (excepto para el individuo 1) y caries activas. Los datos clínicos de los donantes se muestran en la Tabla 1. Las muestras de placa dental supragingival se tomaron de todas las superficies libres de los dientes con curetas estériles, combinándolas en un solo tubo. Se obtuvo una muestra mensual de cada voluntario durante cuatro meses. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado por escrito y el protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética DGSP-CSISP, (Autoridad Sanitaria Valenciana). Después de tomar la muestra se procedió inmediatamente a la extracción del DNA, mediante el kit AllPrep ADN/RNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, más la adición de un tratamiento con lisozima (5mg/ml, a 37 °C durante 30 minutos) .

Muestras	Edad	Cepillado por día	Tiempo Biofilm ¹	Índice CAO ⁴	Careados	Ausentes	Obturados	Maloclusión ²	Estado Gingival	Higiene Oral ³
A	21 ^a	2	10	4	0	1	3	Si	H	0
B	23	2	3	4	0	4	0	Si	PB	2
C	42 ^b	3-4	5	6	0	4	2	Si	PB	1
D	28	2	11	13	0	1	12	Si	H	1
E	47	1	11	13	0	3	10	No	H	1
F	31	2	10	9	0	4	5	No	MI	1
G	25	2	4	9	0	4	5	No	H	1
H	50 ^c	3	3	4	0	2	2	No	H	1
I	28	3	1	6	0	0	6	Si	MI	1
J	50	2-3	3	12	0	2	10	Si	H	0

Tabla 1. Datos clínicos de los diez donantes de placa dental supragingival para el estudio. ¹Horas después del último cepillado de dientes, ² mal alineamiento de los dientes, ³Indica índice de Higiene oral Índice mide la superficie del diente cubierta con sarro y depósitos blandos: Ausencia de la placa dental, sin adhesión a la sonda (0); ausencia de placa, pero se adhiere a la sonda (1); placa moderada (2). ⁴El índice CAO es el promedio de dientes permanentes cariados (C), ausentes (A) u obturados (O). Se trata de una expresión cuantitativa del historial de caries de los dientes permanentes. ^ahabía tomado antibióticos en los últimos 3 meses. ^bAgnesia inc. lat. Sup. ^cDieta vegetariana.

2.2.2. Amplificación por PCR y pirosecuenciación.

Las primeras 500 pares de bases (pb) del gen 16S ARNr fueron amplificados con los cebadores universales eubacterianos 27F (= 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' =) y 533R (= 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCACG-3' =) mediante el uso de la polimerasa de alta fidelidad de AB-Gene (Thermo Scientific) con una temperatura de hibridación de 52°C y 20 ciclos totales en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para reducir al mínimo los sesgos de amplificación (Sipos R. y col. 2007). Los cebadores universales contienen los adaptadores de pirosecuenciación A y B más un "código de barras" de 8-pb específico para cada muestra, que se incorporó en el cebador directo (McKenna P. y col. 2008). Los códigos de barras difieren unos de otros en al menos 2 nucleótidos para evitar errores en la asignación a la muestra. Cinco PCRs se realizaron por muestra; los productos de PCR se agruparon antes de la purificación mediante el uso del kit Ultrapure PCR purification (Roche). El DNA final por muestra se midió mediante fluorescencia mediante el fluorímetro Modulus 9200 de Turner Biosystems. Los Productos de PCR fueron secuenciados por el extremo del cebador directo mediante el

secuenciador GS-FLX con la química Titanium (Roche) en el Centro de Investigación en Salud Pública de Valencia, España. Se usó un octavo de placa para cada grupo de 20 muestras.

2.2.3. Análisis de secuencias.

Las lecturas con un valor promedio de calidad inferior a 20 y/o con más de cuatro ambigüedades en las regiones homopoliméricas en los primeros 360 flujos fueron excluidos del análisis. Sólo las lecturas con más de 200 pb se consideraron para el estudio, ya que se ha demostrado que la precisión de asignación taxonómica disminuye dramáticamente en lecturas más cortas de 200 pb, reduciendo el posible inflado artefactual de los índices de diversidad (Claesson MJ. y col. 2010). Posteriormente se filtraron todas las lecturas por el software Bellerophon (Huber T. y col. 2004) eliminando así posibles quimeras de PCR. Las secuencias fueron asignadas a cada muestra mediante el código de barras de 8 pb, pasándose posteriormente por el clasificador de la Ribosomal Database Project (Cole JR. y col. 2009), asignándose cada lectura a un filo, clase, familia y género, siempre y cuando la asignación taxonómica fuera inequívoca en un 80% de umbral de confianza, siendo este umbral el que asegura que la asignación de cada lectura tiene una precisión >95% a estos niveles taxonómicos. Un alineamiento de todas las secuencias de calidad de cada muestra se utilizó para generar árboles filogenéticos con FastTree (Price MN. y col. 2010), con los que llevar a cabo análisis de coordenadas principales (PCoA) con UniFrac (Lozupone C. y col. 2006) mediante la agrupación al 97% de identidad, representando este grupo de lecturas una estimación de secuencias pertenecientes a la misma especie (Sogin M. y col. 2006). La matriz para la realización del PCoA se basa en la distancia entre los árboles filogenéticos. Esta distancia se mide en términos de la longitud de las ramas de los árboles que son únicos para cada muestra (Lozupone C. y col. 2006).

2.3 Resultados

2.3.1. Diversidad microbiana en la placa dental supragingival.

Tras el filtrado de calidad, se obtuvo un promedio de 1979 secuencias por muestra, con una longitud media de 463 pares de bases (pb). La asignación taxonómica a nivel de género mostró diferencias entre los individuos (Figura 1). Por ejemplo, la microbiota de la placa dental de algunos individuos estaba dominada por *Corynebacterium* o *Neisseria*, mientras que *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* o *Actinomyces* fueron otras de las principales bacterias amplificadas en otros donantes. Esta

variación inter-individual es coherente con las características clínicas irregulares de los donantes.

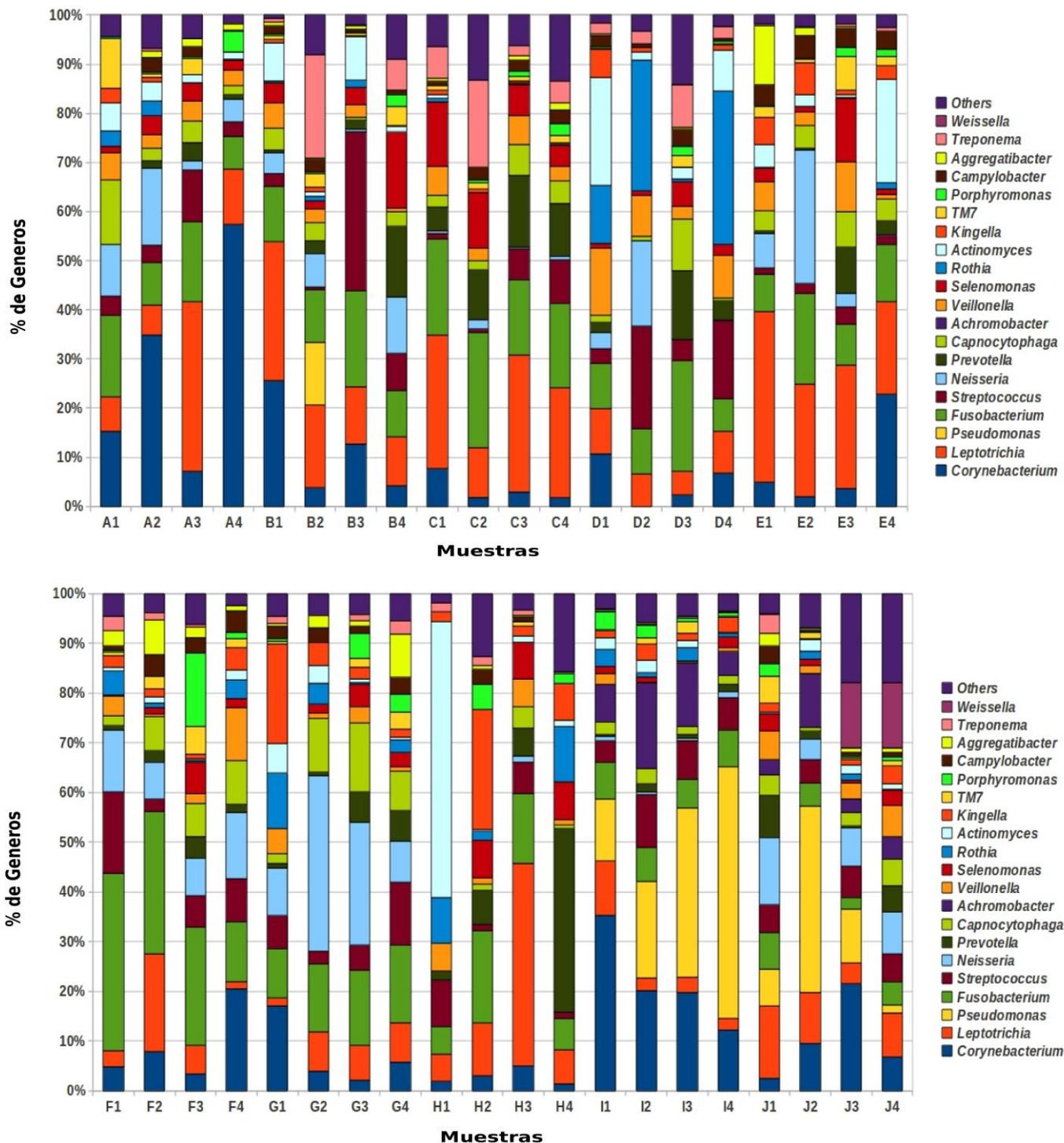


Figura 1. Diversidad bacteriana en muestras de placa dental supragingival a lo largo del tiempo. Se muestra la asignación taxonómica de las 40 muestras a nivel de género. Estas 40 muestras corresponden a 10 voluntarios que donaron placa dental supragingival una vez al mes durante 4 meses consecutivos, obteniendo un total de 4 muestras por voluntario. Se observa que la composición bacteriana es diferente en muchos de los voluntarios a lo largo del tiempo, además de que existe una notable variación interindividual. Abreviaturas: La letra muestra el voluntario y la unidad posterior si corresponden al primer, segundo, tercer o cuarto mes.

2.3.2. Diversidad bacteriana de la placa dental supragingival a través del tiempo.

Aunque la composición bacteriana a través del tiempo se mantuvo relativamente estable para algunos individuos (por ejemplo, las muestras A o J), se observaron diferencias dramáticas para la mayoría de ellos (Figura 1). Estas incluyen la desaparición total de varios géneros en uno o más puntos de tiempo (por ejemplo, la repentina ausencia de *Rothia* en el tercer mes del individuo D o la de *Neisseria* en el cuarto mes en el individuo E) o por contra, las apariciones repentinas de algún género dado en puntos concretos de tiempo (como *Treponema* en el segundo mes del individuo B, o *Weisella* en el 3er y 4º mes para el individuo J).

También se encontró que el nivel de diversidad bacteriana, según las estimaciones del índice de Chao (que se relaciona con el número total de especies presentes) es extremadamente variable en los individuos a través del tiempo (Figura 2A), como indican los aumentos repentinos o disminuciones en la diversidad para la mayoría de las muestras. Cuando se calculó el número de taxones compartidos entre las muestras mensuales del mismo individuo, se observó que menos de la mitad de los géneros parecen ser constantes a través del tiempo (Figura 2B). Esto sugiere la presencia tanto de una microbiota núcleo estable como de una parte considerable de microorganismos transitorios que cambian en número dependiendo del tiempo.

Con el fin de visualizar las variaciones intra- e inter-individuales en la composición bacteriana a través del tiempo a nivel de especie, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) que se llevó a cabo incluyendo todas las muestras después de la agrupación de las secuencias al 97% de identidad, siendo este el umbral que por consenso determina los límites pertenecientes a una misma especie (Yarza P. y col. 2008). En el espacio tridimensional que proporcionan los tres componentes principales del análisis, la proximidad entre las muestras indica una composición bacteriana similar. Como se puede observar en la Figura 3, la composición individuos. En algunos casos, las cuatro muestras mensuales de un donante dado se agrupan juntas, lo que indica una comunidad microbiana estable a través del tiempo (por ejemplo, individuo I), pero la mayor parte de los individuos tienen una composición bacteriana divergente en los diferentes meses, incluidos algunos casos de extrema variabilidad (por ejemplo, el individuo A, donde las cuatro muestras mensuales se encuentran dispersas en todo el espacio del PCoA). No hemos encontrado una asociación de ninguna característica clínica de la Tabla 1 (e.j. edad, sexo, patologías, dieta, higiene, etc) con la estabilidad o divergencia de la composición bacteriana.

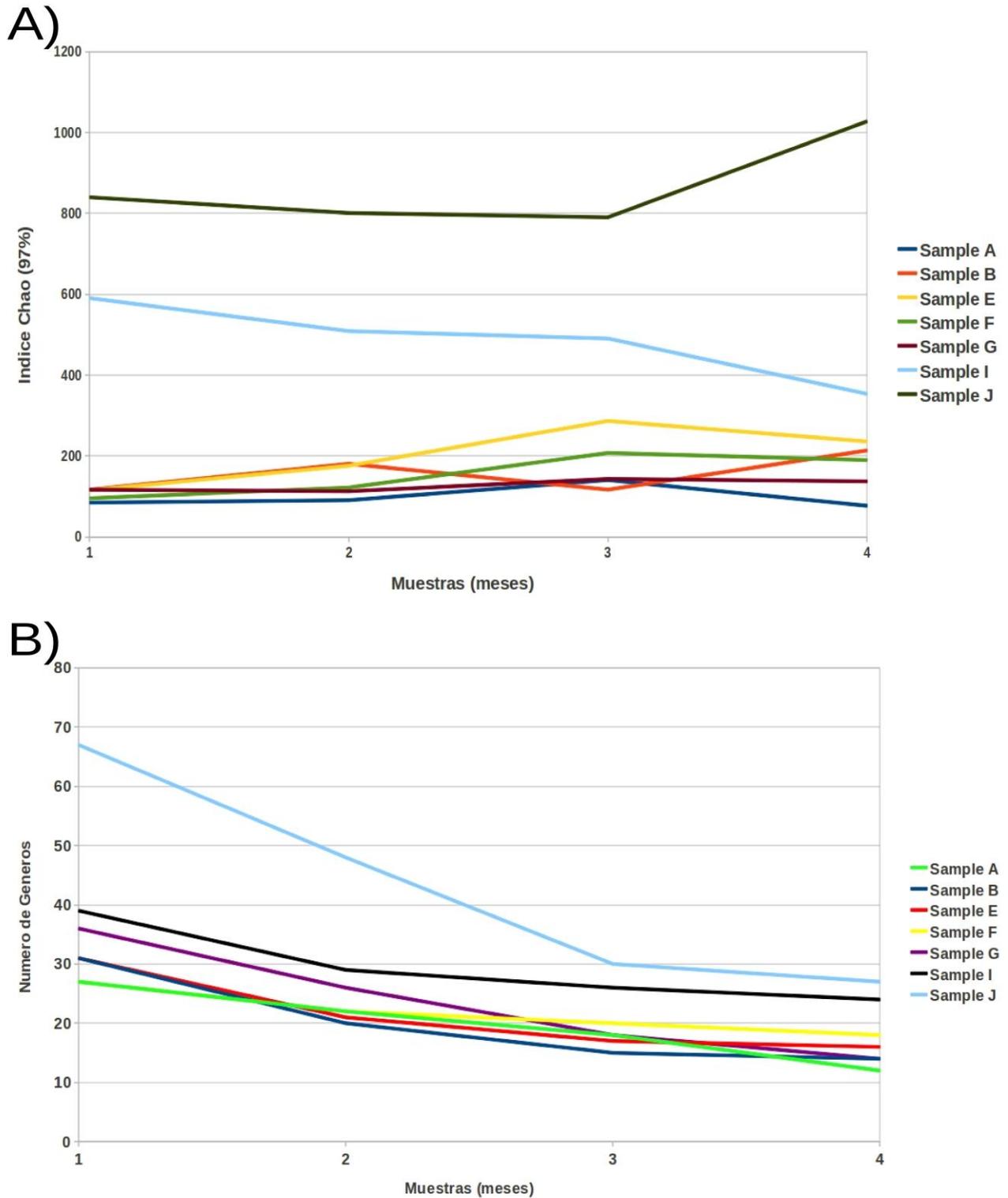


Figura 2. Variación temporal de la diversidad bacteriana de la placa dental a lo largo del tiempo. La figura 2.A muestra la variación en el número estimado de especies según los cálculos del Índice de Chao, después de agrupar las secuencias con más del 97% de identidad. La figura 2.B muestra el número de géneros bacterianos compartidos entre los meses del 1 al 4, revelando la existencia de una parte considerable de la población microbiana que es transitoria. Para maximizar la precisión en las estimaciones de diversidad, sólo se incluyeron los voluntarios que contenían > 700 secuencias filtradas por calidad y longitud en las cuatro muestras temporales.

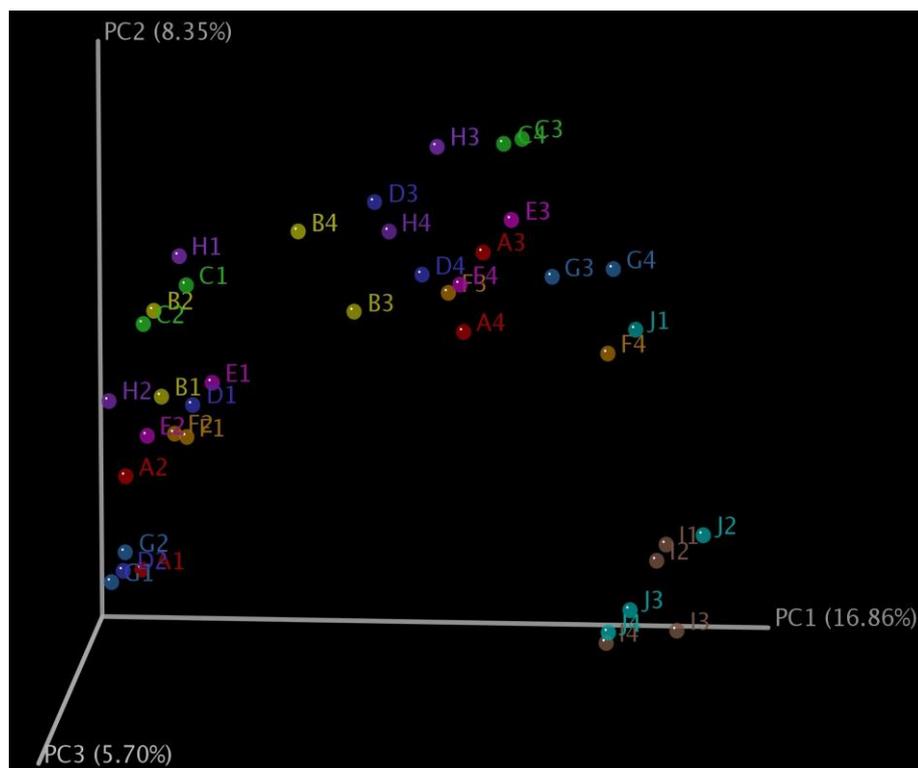


Figura 3. Análisis de coordenadas principales (PCoA) para las 40 muestras incluidas en el estudio. Los códigos de las muestras indican el individuo (A a J) y mes de muestreo (1 a 4), y ocupan una posición en el espacio según su composición microbiana de acuerdo con los tres componentes principales del análisis, que en conjunto explican más del 30% de la variación. Las muestras que se agrupan juntas tienen una composición bacteriana similar. Algunos individuos tienen las cuatro muestras con una composición bacteriana similar, pero la mayoría de los individuos tienen muestras superpuestas, lo que indica que los estudios comparativos a partir de una sola muestra por individuo pueden ser engañosos.

2.4 Discusión

Recientes estudios sobre la diversidad bacteriana en la cavidad oral han identificado un conjunto de bacterias que se encuentran de forma consistente en diferentes individuos (Zaura E. y col. 2009; Lazarevic V. y col. 2010). Esto ha dado lugar al concepto de "Núcleo del microbioma" o las bacterias más comunes entre la mayoría de los individuos. Sin embargo, la estabilidad de las bacterias o un grupo de estas a través del tiempo en un individuo dado no ha sido todavía bien estudiado (Caporaso JG. y col. 2011). Los datos presentados en el presente capítulo revelan importantes diferencias en la composición bacteriana de la placa dental supragingival a través del tiempo. Se procesó una muestra por mes de cada voluntario durante cuatro meses, observando en varios individuos el aumento de ciertos grupos taxonómicos o por contra que otros grupos taxonómicos disminuían en proporción. Así mismo, algunos géneros bacterianos desaparecían por completo y otros pasaban por aumentos importantes que alteraban considerablemente los índices de diversidad. A pesar de este alto grado de variabilidad, algunos géneros de bacterias se encontraron estables a lo largo del período de muestreo, apoyando la idea de un "núcleo del microbioma" que estaría formado por bacterias estables en la cavidad oral frente a factores ambientales o relacionados con el huésped como la dieta, el contacto con otros seres humanos o cambios en el sistema inmune, entre otros. No obstante, el alto grado de

variabilidad encontrada indica que todos estos factores, que son parte de la vida diaria, tienen un efecto dramático en la microbiota oral y que una gran proporción de las bacterias detectadas mediante técnicas moleculares son, de hecho, transitorias. Por lo tanto, la extraordinaria diversidad que se detectó en muestras orales por técnicas de nueva generación de secuenciación (Keijser BJ. y col. 2008) podría ser en parte debido a la amplificación de DNA a partir de bacterias transitorias de la cavidad oral, no activas o incluso muertas. En el futuro, los métodos moleculares basados en RNA podrían aplicarse con el fin de identificar bacterias activas en el nicho oral y que contribuyen funcionalmente al ecosistema (Frias-López J. y col. 2012).

La naturaleza transitoria de la mayoría de las bacterias habitantes de la microbiota oral tiene consecuencias importantes para futuros estudios con vistas a la composición bacteriana en relación a las condiciones de salud y enfermedad, así como al efecto de los antibióticos o cualquier factor ambiental. Nuestros datos indican que las muestras de un mismo individuo se superponen con frecuencia en la composición bacteriana con otros individuos de diferente edad, sexo, e historia clínica. Por lo tanto, un gran cuidado se debe aplicar a la hora de seleccionar los individuos para dichos estudios, de tal manera que cualquier factor de ruido o variabilidad debería ser tenido en cuenta, incluyendo el tiempo de formación de la placa dental, los hábitos de higiene, el uso de antisépticos orales o enjuagues bucales, la dieta, la hora de muestreo en el día, la ausencia de otras enfermedades aparte de aquella bajo estudio, el uso de medicamentos o los hábitos de tabaquismo, entre otros, con el fin de minimizar la variabilidad asociada. Si se utiliza una sola muestra por cada individuo, las diferencias observadas entre los grupos de estudio pueden no deberse únicamente a los supuestos factores, sino que podrían estar fuertemente influenciadas por la variación intraindividual. Por lo tanto, nuestros datos podrían aconsejar el uso de más de una muestra por cada individuo para tener esta variación temporal en cuenta y reducir al mínimo el ruido estadístico asociado. Este efecto de muestreo puede ser incluso más agudo en muestras de saliva, utilizada frecuentemente para estudios etiológicos y epidemiológicos, dada la mayor exposición de la saliva a las fluctuaciones ambientales, tal como se ha revelado por técnicas moleculares (Tian Y. y col. 2010).

Por último, el uso de organismos que promueven la salud para restablecer el equilibrio microbiano en la cavidad oral (Capítulo 7) ha sido propuesto para la prevención de la caries dental, periodontitis o halitosis (Belda-Ferre P. y col. 2012; Bowen DM. y col. 2013; Twetman S. 2012) pero no está claro en qué medida este tipo de estrategias que conllevan el uso de probióticos o prebióticos puede ser capaz de cambiar una comunidad microbiana ya establecida, como proponen las terapias de reemplazo bacteriano (Tagg JR. Y Dierksen KP. 2003). Sin embargo, si las comunidades bacterianas son

tan lábiles, tal y como parecen indicar los datos mostrados en este capítulo, los cambios en la composición microbiana promovidos por cepas probióticas podría ser un enfoque plausible para restablecer el equilibrio del ecosistema y mejorar la salud oral.

III.

Capítulo 3.

El microbioma del tracto bronquial de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

3.1 Introducción

El árbol bronquial y el parénquima pulmonar son considerados estériles en sujetos sanos, pero microorganismos potencialmente patógenos se han recuperado a partir de secreciones bronquiales en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) durante los períodos de estabilidad clínica y, en particular, durante las exacerbaciones, es decir, cuando la carga bacteriana aumenta significativamente (Rosell A. y col. 2005; Wilkinson TMA. y col. 2003). Cuando el esputo se ha usado para la identificación de la colonización bronquial por microorganismos potencialmente patógenos en EPOC estable, se han obtenido cultivos positivos entre una quinta parte y tres cuartas partes de los pacientes, en la mayoría de los casos presentando un único microorganismo (Sethi S. y col. 2002; Hill AT. y col. 2000). Los cultivos positivos para microorganismos potencialmente patógenos se han encontrado en un tercio de los pacientes con EPOC en ausencia de síntomas de infección bronquial cuando se toma muestra de las vías inferiores, evitando tomar muestra de la oro-faringe bajo condiciones de esterilidad. Las bacterias más frecuentemente encontradas fueron *Haemophilus influenzae*,

Streptococcus pneumoniae, y *Mycobacterium catarrhalis* (Rosell A. y col. 2005), un hallazgo que confirma la presencia de estos microorganismos en la parte inferior del árbol bronquial de los pacientes con EPOC. La colonización bronquial ha sido también demostrada en muestras de lavado broncoalveolar obtenidas a partir de pacientes con EPOC, recuperando secreciones periféricas del árbol bronquial (Chin CL. y col. 2005; Sethi S. y col. 2006; Soler N. y col. 1999). La mayoría de bacterias patógenas se han cultivado a partir de pacientes con EPOC estable, con una carga microbiana baja (< 100.000 UFC/ml), sin embargo no se asocia con una respuesta inflamatoria neutrofílica (Patel IS. y col. 2002; Wilkinson TMA. y col. 2006). En contra, con alta carga bacteriana se encuentran casi exclusivamente *H. influenzae* y bacterias comensales (Marín A. y col. 2010; Marín A. y col. 2012). Estos resultados confirman que los microorganismos potencialmente patógenos se pueden encontrar en los árboles bronquiales de algunos pacientes con EPOC. Esta colonización puede estar relacionada con las bacterias oro-faríngeas que migraron al árbol bronquial o a la microbiota que coloniza específicamente el árbol bronquial inferior (VanScoy RE. 1977).

Mediante las técnicas de cultivo se infradiagnostica a los pacientes con una colonización bronquial por debajo del límite de detección del cultivo de esputo, identificando una décima parte de las muestras de esputo con cultivo negativo (Murphy TF. y col. 2004). El uso de métodos moleculares tales como la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen ribosómico 16S (ADNr), seguido por la clonación y secuenciación de Sanger tradicional en muestras de secreción bronquial, ha permitido la identificación de especies bacterianas no detectadas anteriormente por cultivos selectivos utilizados para la identificación de microorganismos potencialmente patógenos y, más recientemente, la aplicación de pirosecuenciación ha llevado el estudio de la diversidad microbiana a un nivel de detalle sin precedentes (Charlson ES. y col. 2011; Erb-Downward JR. y col. 2011; Hilty M. y col. 2010). Estos enfoques han demostrado que existe una amplia diversidad de microorganismos en las secreciones respiratorias que no se detectan mediante cultivo (Guss AM. y col. 2011; Galiana A. y col. 2014) y sugieren que el microbioma bronquial puede ser heterogéneo en la EPOC, con diferencias significativas entre las secciones bronquiales (Erb-Downward JR. y col. 2011). Por consiguiente, antes de la iniciación de un estudio amplio centrado en el microbioma del árbol bronquial en pacientes con EPOC bien caracterizados, es necesario examinar la diversidad microbiana a través de sus diferentes secciones, de modo que la interpretación de los resultados obtenidos mediante el muestreo de los diferentes compartimentos bronquiales sea precisa.

El objetivo del presente capítulo es identificar las bacterias de las vías respiratorias inferiores no identificadas a través de cultivo en pacientes con EPOC, en ausencia de signos y síntomas de infección bronquial, así como examinar la complejidad de la microbiota en estos pacientes mediante el uso de la amplificación y pirosecuenciación del gen ribosómico 16S ARNr. Además, hemos tratado de comparar la diversidad microbiana superior (esputo y aspirado bronquial) y muestras del árbol bronquial inferior (lavado broncoalveolar y mucosa bronquial) de los mismos individuos al mismo tiempo, bajo la suposición de que estas muestras representan diferentes compartimentos del árbol bronquial.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1. Diseño del estudio y obtención de muestras.

Pacientes con bronquitis crónica de 50 años de edad o más, fueron reclutados entre enero y junio de 2010 en el hospital universitario de la región metropolitana de Barcelona, por el equipo del Dr. Eduard Monsó. Los voluntarios no reportaron síntomas agudos de infección respiratoria en los últimos 6 meses y no habían sido tratados con antibióticos durante este período, con cultivos de esputo disponibles y negativos de microorganismos potencialmente patógenos en la inscripción previa. Las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas reconocidas como agentes causantes de infecciones respiratorias, tales como *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y enterobacterias fueron consideradas como microorganismos potencialmente patógenos (Cabello H. y col. 1997; Murphy TF. y col. 2007; Sethi S. y col. 2007). Los pacientes con deterioro de la función pulmonar grave o que requieren tratamiento regular para la enfermedad respiratoria crónica fueron excluidos del estudio. Los criterios de exclusión adicionales incluyen la hospitalización durante el año anterior y cualquier enfermedad o enfermedades graves que necesitan tratamiento regular. Los pacientes tratados quirúrgicamente por cáncer y libre de recurrencia por infección aguda respiratoria en un mínimo de 5 años fueron aceptados para su inclusión. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito, y el protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Regional de Ética. Cuatro tipos de muestras respiratorias (esputo, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar, y mucosa bronquial) se tomaron de cada individuo, siendo su función pulmonar normal o sólo mostrando deterioros leves/moderados que no requirieron tratamiento regular (tabla 1).

Se tomaron datos socio-demográficos y clínicos de cada voluntario, incluyéndose también el hábito de fumar, antecedentes médicos, síntomas respiratorios y tratamientos. Todos los pacientes realizaron espirometrías con un espirómetro dry rolling-seal (Spirometrics, Gray, ME) de acuerdo con las técnicas estándar (American Thoracic Society, 1987). Se procedió a medir la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV_1). comparándolos con la edad y los valores de referencia de altura ajustados obtenidos de voluntarios seleccionados de la provincia de Barcelona (Roca J. y col. 1986). Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 18 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Las muestras de esputo inducido se obtuvieron y procesaron dentro de los 60 minutos que duró la visita de acuerdo con métodos estándar (Pin I. y col. 1992; Pizzichini E. y col. 1996). En resumen, el paciente se trató con un agonista β_2 inhalado 10 minutos antes de la nebulización con solución salina isotónica (0,9%), seguido de concentraciones crecientes de solución salina hipertónica (3, 4, y 5%) durante 7 minutos con cada concentración. Después de cada inducción, el paciente intentó obtener una muestra de esputo tosiendo, siendo suspendido el procedimiento de nebulización cuando el volumen de esputo recogido fue ≥ 1 ml (Aaron SD. y col. 2001). La muestra de esputo se cultivó en medios de cultivo selectivos de acuerdo con métodos estándar (Balows A. y col. 1986), considerándose cultivos negativos cuando no crecen microorganismos potencialmente patógenos. La broncoscopia se realiza bajo anestesia local y sedación (pulverizador de lidocaína tópica e intravenosa de midazolam; British Thoracic Society Bronchoscopy Guidelines Committee. 2001; Reed A. 1992), utilizando un vídeo-broncoscopio flexible (BF180, Olympus Optical Co., Tokio, Japón). Un lavado broncoalveolar, una muestra de biopsia de la mucosa bronquial, y un aspirado bronquial se tomaron a través del canal de trabajo del broncoscopio durante el procedimiento. El broncoscopio, después de su procedimiento de esterilización habitual (British Thoracic Society Bronchoscopy Guidelines Committee. 2001), se introdujo por los orificios nasales, pasando a través de las cuerdas vocales sin aspiración y encajándolo en el lóbulo medio derecho para el lavado broncoalveolar, para evitar la contaminación de la muestra por la microbiota orofaríngea (Charlson ES. y col. 2011). La solución salina (50 ml) se infundió, aspiró, y se desechó, después se lavó con 100 ml en el mismo lugar y se recogió, con la recuperación de un volumen $> 30\%$ de la muestra infundida. Posteriormente, la biopsia bronquial se realizó en un subsegmento pulmonar, siendo el aspecto macroscópicamente normal mediante un examen visual, y obteniendo aspirados bronquiales con la punta del broncoscopio en la parte derecha e izquierda de los bronquios principales.

3.2.2. Extracción de ADN.

Las muestras se tomaron entre abril y agosto del 2009 y se mantuvieron a -80 °C hasta que en septiembre de 2009 se procedió a la extracción de ADN. Todas las muestras de esputo, aspirado bronquial y lavado broncoalveolar fueron tratadas previamente durante 15 minutos con un igual volumen de Sputasol (Oxoid, Hampshire, Reino Unido), seguido de una centrifugación durante 15 minutos a 13.000 g. La extracción de ADN genómico a partir de esputo, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar y muestras de la mucosa bronquial (biopsias) se realizó mediante el kit Qiagen DNA blood (Qiagen, Crawley, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones: Las muestras se trataron con 10 ul de una solución de lisis como se ha descrito previamente (Curran T. y col. 2007). Esta solución de lisis consistía en 10 ml de una solución tampón esterilizada por filtración (20 mM Tris [pH 8], 2 mM de EDTA [Sigma], 1,2% de Triton X-100), 500 mg de lisozima (Sigma, Poole, Reino Unido), 50000 U de mutanolisina (Sigma), y 1000 U de lisoestapina (Sigma). Las cantidades de ADN obtenidas variaron entre 80 y 950 ng de esputo, 70 y 1105 ng de aspirados bronquiales, 164 y 1060 ng de lavados broncoalveolares, y 70 y 520 ng de muestras de la mucosa bronquial.

3.2.3. Amplificación mediante PCR del ADN extraído.

Las primeras 300 pb del gen 16S ARNr fueron amplificadas con los cebadores universales eubacterianos 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 338R (5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAGGC-3') usando la polimerasa de alta fidelidad de AB-Gene (Thermo Scientific) con una temperatura de hibridación de 52 °C y un total de 20 ciclos para reducir al mínimo los sesgos de PCR (Sipos R. y col. 2007). Posteriormente se realizó una segunda amplificación utilizando el producto de PCR purificado como molde, modificando esta vez los cebadores universales conteniendo los adaptadores A y B para la pirosecuenciación (Benítez-Paéz A. y col. 2012), más un "código de barras" de 8-pb específicas para cada muestra (McKenna P. y col. 2008). Los códigos de barras eran diferentes en al menos dos nucleótidos para evitar errores de clasificación en las asignaciones de muestra. Un total de cinco PCRs secundarias se necesitaron para obtener una buena cantidad de producto amplificado por muestra, para después purificarse conjuntamente con el kit Ultrapure PCR purification (Roche). El DNA final por muestra se midió mediante fluorescencia usando PicoGreen (Invitrogen) en el fluorímetro Modulus 9200 (Turner Biosystems), para finalmente mezclarse las 12 muestras en cantidades equimolares. Cada grupo de 12 muestras se purificó

adicionalmente y se concentró mediante el uso de filtros Microcon (Millipore) en un volumen final de 20 μ l y una concentración mayor de 100 μ g/ μ l. Los productos de PCR fueron secuenciados unidireccionalmente desde el cebador directo mediante el secuenciador GS-FLX (Roche) en el Centro de Regulación Genómica de Barcelona, España, Utilizándose un dieciseisavo de placa para cada grupo de 12 muestras.

3.2.4. Análisis de las secuencias.

Las lecturas con un valor promedio de calidad inferior a 20 y/o con más de cuatro ambigüedades en las regiones homopoliméricas en los primeros 360 flujos fueron excluidos del análisis. Sólo las lecturas con más de 200 pb se consideraron para el estudio, ya que se ha demostrado que la precisión de asignación taxonómica disminuye dramáticamente en lecturas más cortas de 200 pb, reduciendo el riesgo de sobreestimaciones en los índices de diversidad (Claesson MJ. y col. 2010). Posteriormente se filtraron todas las lecturas por el software de Bellerophon (Huber T. y col. 2004) eliminando así posibles quimeras. Las secuencias fueron asignadas a cada muestra mediante el código de barras de 8 pb, pasándose por el clasificador Ribosomal Database Project (RDP) (Cole JR. y col. 2009), asignándose cada lectura a un filo, clase, familia y género, siempre y cuando la asignación taxonómica fuera inequívoca en un 80% de umbral de confianza, siendo este umbral el que asegura que la asignación de cada lectura tiene una precisión >95% a estos niveles taxonómicos. Para estimar la diversidad total, las secuencias se agruparon al 97% de identidad en nucleótidos sobre el 90% de la longitud de la alineación de la secuencia utilizando el software CD-HIT (Li W. y Godzik A. 2006), y las curvas de rarefacción se obtuvieron con el programa analítico ARarefaction 1.3 (Holland SM. 2003). Para este análisis, las secuencias >97% de identidad se consideraron unidades taxonómicas operacionales (OTU), representando este grupo de lecturas la misma especie (Sogin y col. 2006). Las curvas de rarefacción también se obtuvieron utilizando sólo aquellas secuencias asignadas a un género por el clasificador RDP, como una estimación conservadora de la diversidad a este nivel taxonómico.

Los análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizaron con UniFrac (Lozupone C. y col. 2006) mediante la agrupación en un 97% de identidad de las secuencias con la opción de análisis ponderado, que compara la diversidad 16S ARNr estimada con un enfoque filogenético, teniendo en cuenta tanto las lecturas asignadas taxonómicamente, como las no asignadas. La composición de las muestras respiratorias se comparó con las muestras del Capítulo 1 (muestras orales humanas), siendo todas las lecturas de la misma región del gen 16S ARNr. La matriz para la realización de un PCoA

mediante el programa UniFrac se basa en la distancia entre los árboles filogenéticos correspondientes a cada muestra. Esta distancia se mide en términos de las longitudes de las ramas de los árboles que son únicos para una muestra o la otra (Lozupone C. y col. 2006).

Las comparaciones bidireccionales en la composición bacteriana se realizaron con UniFrac (Lozupone C. y col. 2006) con el fin de medir si las comunidades microbianas en diferentes tipos de muestras eran significativamente diferentes. Se obtuvo un árbol incluyendo todas las secuencias de cada tipo de muestra, y las muestras se consideraron significativamente diferentes si el valor UniFrac para el árbol es mayor que el que se esperaría si las secuencias fueran distribuidas al azar entre las muestras. Las identificaciones de la muestra permutan al azar 1.000 veces para obtener un valor p que represente la fracción de árboles permutados con valores UniFrac mayores o igual a la del árbol, con correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples (Lozupone C. y col. 2006).

3.3. Resultados

3.3.1. Elección de participantes.

Cinco hombres y una mujer, todos ellos exfumadores con EPOC moderada fueron incluidos en el estudio (edad media: 71 años). Cuatro de los pacientes tenían bronquitis crónica. Todos los pacientes mostraron un deterioro moderado en su función pulmonar (mediana de FEV₁ posbroncodilatador: 66% respecto a la de referencia) que no requirió tratamiento regular. Cuatro pacientes habían sido tratados quirúrgicamente por cáncer (tres pacientes con cáncer de pulmón y un paciente de cáncer de mama), todos ellos libres de recurrencia de la enfermedad después de la cirugía por un mínimo de 5 años. Los cultivos de esputo obtenidos en la iniciación del estudio y en dos ocasiones en el año anterior fueron negativos para microorganismos potencialmente patógenos. Los datos clínicos para el grupo de estudio se muestran en la Tabla 1.

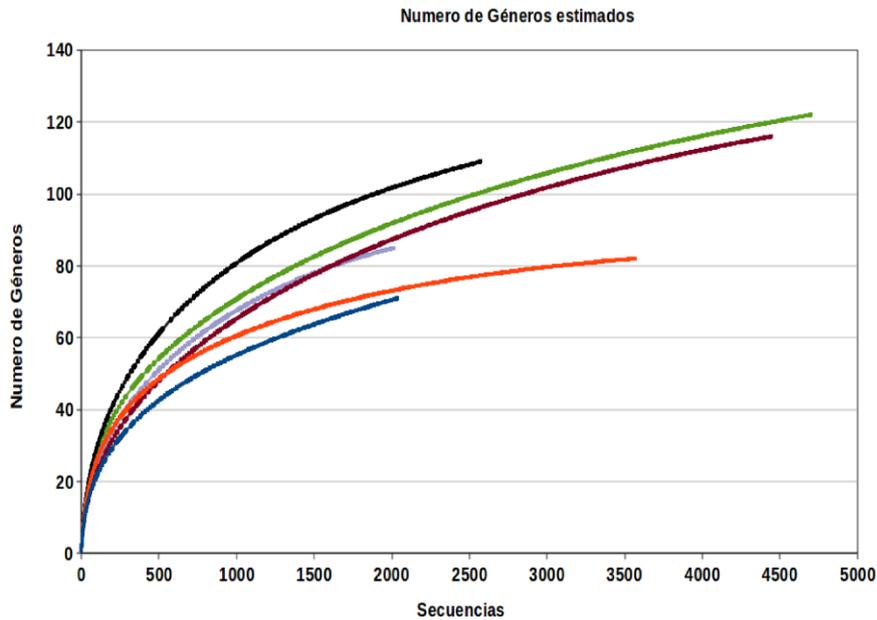
Paciente	Genero	Fumador	Historial de cáncer	Cirugía del cáncer	Gravedad EPOC ^a	FEV ₁ ^b	N° de secuencias ^c
1	Hombre	Exfumador	Pulmón	Lobectomía	Moderada	72	4362
2	Mujer	Exfumador	Pecho	Mastectomía	Moderada	76	2477
4	Hombre	Exfumador	Pulmón	Lobectomía	Moderada	41	2980
5	Hombre	Exfumador	Ninguno	-	Moderada	60	6858
7	Hombre	Exfumador	Ninguno	-	Moderada	72	5497
8	Hombre	Exfumador	Pulmón	Lobectomía	Moderada	42	2619

Tabla 1. Características de la población estudiada. ^aDe acuerdo con el criterio GOLD (www.goldcopd.org), ^bFEV₁, volumen expirado forzado en 1 segundo, ^cSecuencias del gen 16S ARNr obtenidas después de filtrar por longitud y calidad.

3.3.2. Diversidad microbiana en el árbol bronquial.

Se obtuvieron un promedio de 1.033 secuencias del gen 16S ARNr en las 24 muestras, que corresponden a esputo, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar, y mucosa bronquial (biopsia) de los seis voluntarios con EPOC. Si las secuencias de los cuatro tipos de muestra se agrupan por voluntario, las curvas de rarefacción a nivel de género alcanzan la saturación para los individuos con una menor diversidad microbiana, y se encontró que el número total de géneros bacterianos está entre 80-140 por voluntario, mostrando diferencias en la composición bacteriana entre ellos (Figura 1A). Se observaron diferencias importantes en la diversidad entre los tipos de muestra (Figura 1B), mientras que no se observaron diferencias importantes en la diversidad entre las muestras bronquiales superior e inferior. La diversidad bacteriana fue menor en el esputo, que alcanzó la saturación en alrededor de 60 géneros de bacterias, y mucho más alto en el lavado broncoalveolar y las muestras de biopsia (Fig. 1B y 2). Cuando las secuencias se agruparon al 97% de identidad de secuencia (el umbral consenso para lecturas que pertenecen a la misma especie), las curvas de rarefacción y el índice Chao1 sugieren una diversidad total de más de 500 especies por muestra.

A



B

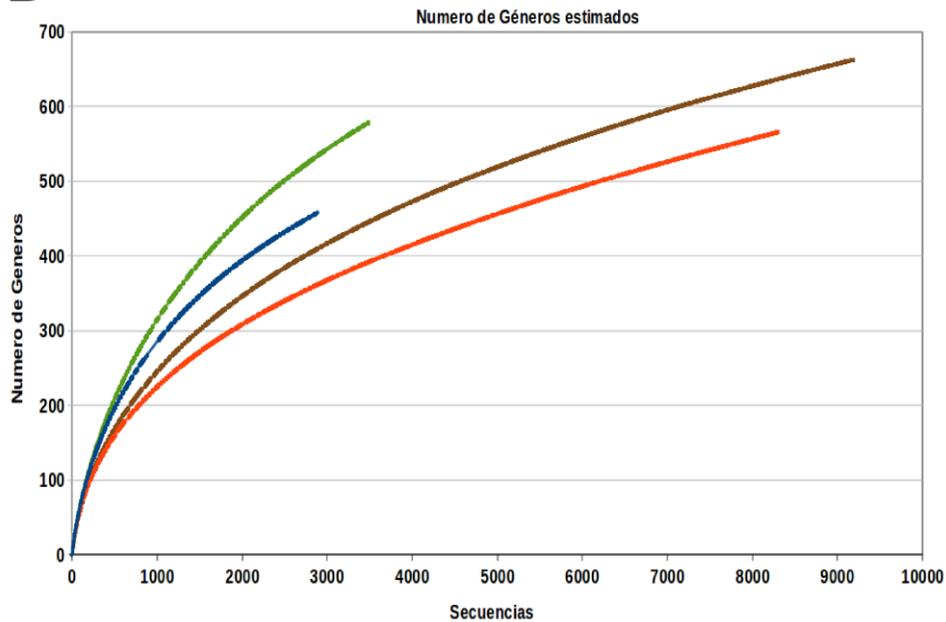


Figura 1. Diversidad bacteriana en muestras del tracto respiratorio. El gráfico muestra las curvas de rarefacción que indican el número de géneros bacterianos asignados en relación con el número de secuencias de 16S ARNr analizadas, agrupados por individuo (A) y el método de muestreo (B). Abreviaturas: Sp (esputo), Ts (tejido), BAL (lavado broncoalveolar), BAs (aspirado bronquial).

La composición bacteriana varió entre individuos, siendo más similar para los mismos tipos de muestra (Figura 2). Los phyla de bacterias más comúnmente amplificadas fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*. Los géneros bacterianos más comunes amplificadas en las muestras correspondieron a *Streptococcus*, *Prevotella*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium* y *Neisseria*, que en conjunto representan el 60% del número total de secuencias. Algunos de los géneros más frecuentes, en particular en el aspirado bronquial y muestras de esputo, corresponden a géneros

comunes en la cavidad oral, como *Veillonella*, *Fusobacterium* o *Prevotella*. Secuencias con máxima identidad a *Legionella* y *Mycoplasma* también fueron identificados en las muestras. A pesar de las cortas longitudes de secuencia de las lecturas, se asignaron éstas a nivel de especie, comparándolas con la base de datos de la RDP. Aunque esta asignación sea poco robusta, un análisis más detallado de estos géneros es de interés en pacientes con EPOC. Las asignaciones de estas secuencias sugieren que probablemente corresponden a *Legionella dresdenensis*, una especie no asociada con casos clínicos aislada a partir de agua de río, y las especies no patógenas *Mycoplasma orale* y *M. salivarium*.

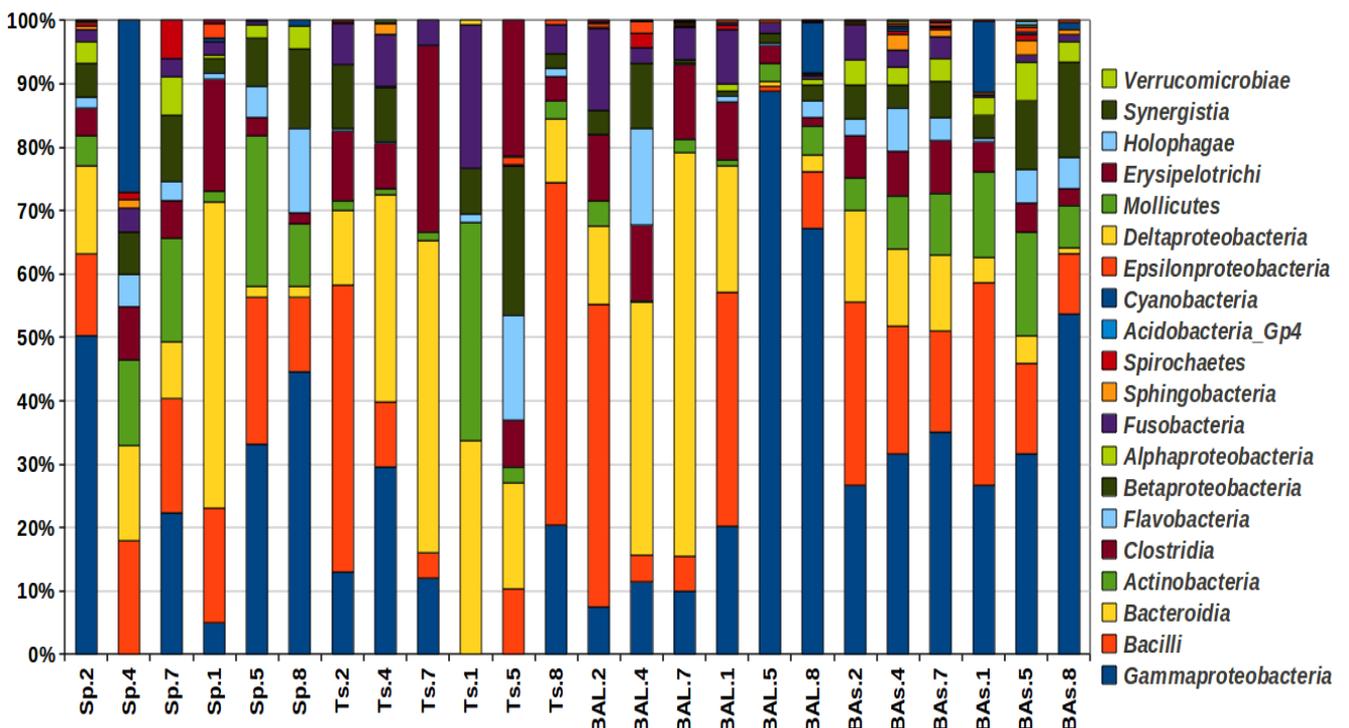


Figura 2. Asignación taxonómica de las 24 muestras a nivel de clase bacteriana. La composición bacteriana en muestras de esputo parece ser particularmente diferente al de otros tipos de muestras de un mismo individuo. Abreviaturas: Sp (esputo), Ts (tejido), BAL (lavado broncoalveolar), BAs (aspirado bronquial).

3.3.3. El microbioma en los diferentes compartimentos del árbol bronquial.

La composición bacteriana fue similar para el mismo tipo de muestra (Figura 2), mientras que no se observaron diferencias importantes en la diversidad entre las muestras bronquiales superior e inferior. La diversidad bacteriana fue menor en el esputo, que alcanzó la saturación alrededor de 60 géneros de bacterias, y mucho más alta en el lavado broncoalveolar y las muestras de biopsia (Figuras 1B y 2). Algunos de los géneros más frecuentes en el esputo y el aspirado bronquial corresponden a habitantes comunes de la cavidad oral, incluyendo *Veillonella*, *Fusobacterium* o *Prevotella* spp. Con el fin de

probar las diferencias en la composición bacteriana entre los cuatro tipos de muestras, se realizó un PCA para todos las lecturas del gen 16S ARNr agrupados al 97% de similitud, dando una resolución más alta que la asignación de género y teniendo en cuenta todas las lecturas a nivel de especie. Los dos componentes principales representaron más del 83% de la variación de los datos, y el gráfico muestra que la mucosa bronquial y muestras de lavado broncoalveolar se agrupan, mientras que las muestras de esputo y de aspirado bronquial eran distintas a las muestras de las vías bronquiales bajas, así como diferentes entre ellos (Figura 3). Esto fue confirmado por las comparaciones dos a dos en la composición microbiana, que mostró diferencias estadísticamente significativas entre el esputo y los otros tipos de muestras (distancia UniFrac, $P < 0,002$ en todos los casos), mientras que el lavado broncoalveolar y biopsias no fueron estadísticamente diferentes (distancia UniFrac, $P=0.6$). La similitud entre el microbioma de lavado broncoalveolar y la mucosa bronquial sugieren que ambas muestras representan el mismo compartimento bronquial. Aspirados bronquiales y esputo son menos diversos y contienen géneros ausentes del árbol bronquial menor pero que se encuentran en la cavidad oral de individuos sanos. Sin embargo, estas muestras no son sólo un subconjunto de la diversidad total, sino que también contienen muchas especies que están ausentes en las muestras de tejido. Cuando muestras de la cavidad oral de individuos sanos, amplificadas por PCR y secuenciadas por el mismo procedimiento (Capítulo 1), se incluyeron en el análisis, se puede observar que los valores positivos del componente principal del análisis separa esputo y las muestras de la cavidad oral de los demás, mientras que el tercer componente separa aspirado bronquial y las muestras de la cavidad oral de los otros tipos de muestras (Figura 3). Por lo tanto, las muestras de aspirados bronquiales y las de esputo tienen una composición microbiana parcialmente similar a la encontrada en la cavidad oral. Dado que las muestras de esputo son probablemente las muestras clínicas pulmonares más comunes, ya que son fáciles de obtener y no invasivas, debe tenerse en cuenta que no son en absoluto representativas de la microbiota que habita las vías respiratorias inferiores.

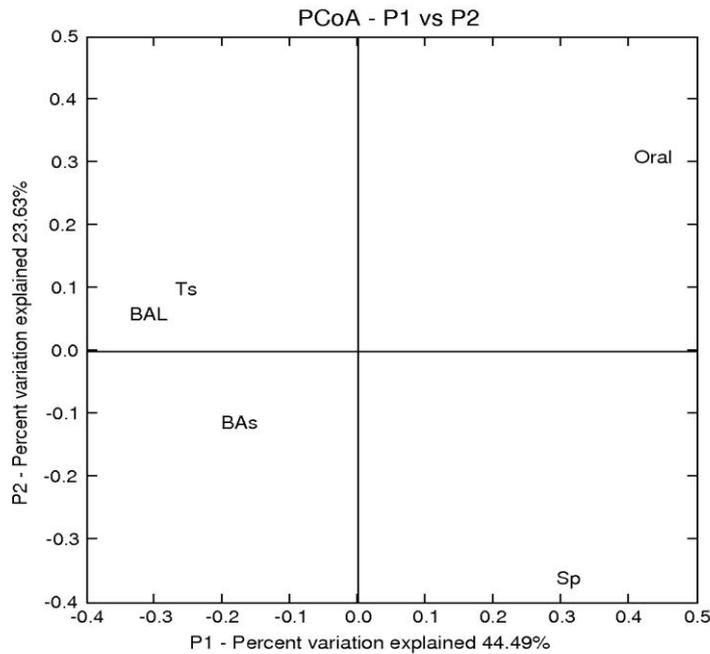
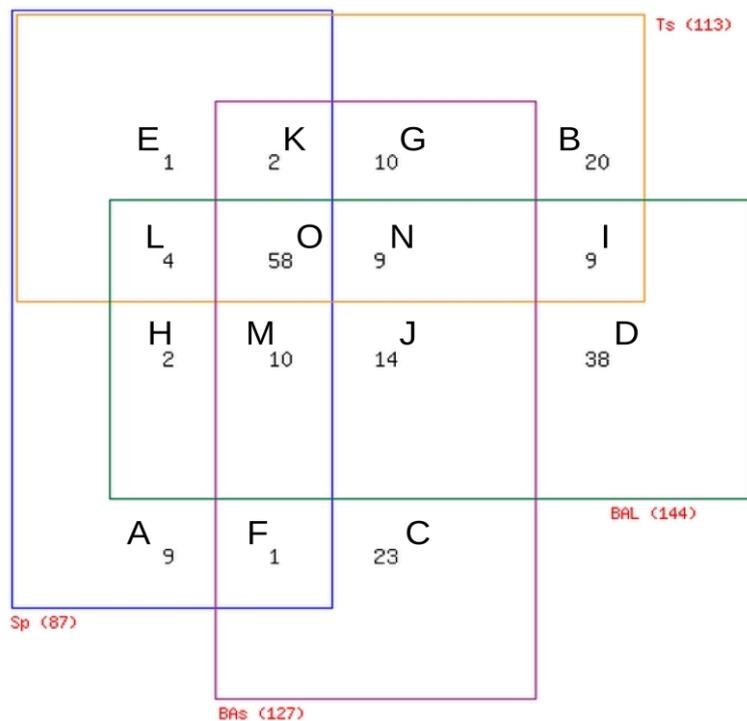


Figura 3. Análisis de componentes principales de los cuatro tipos de muestra de vías respiratorias (n=6 para cada tipo de muestra) y las muestras de la cavidad oral de los individuos sanos (n=16) de acuerdo con la composición microbiana, como se infiere por pirosecuenciación del gen 16S ARNr. Se obtuvieron resultados similares usando el tercer componente (datos no mostrados). Abreviaturas: Sp (esputo), Ts (tejido), BAL (lavado broncoalveolar), BAs (aspirado bronquial), Oral (placa dental supragingival).

La Figura 4 muestra los géneros compartidos y únicos para cada muestra del árbol bronquial, indicando que 43 géneros se comparten entre todos los tipos de muestra (Anexo 3.1). Aunque aparece un gran número de géneros que podrían ser únicos para cada tipo de muestra, la mayoría de ellos son detectados con una sola lectura (singletons) entre todas las secuencias. Cuando estos singletons son excluidos, los géneros exclusivos de cada tipo de muestra se limitan a *Limbobacter* en el esputo;



Arcobacter, *Blautia*, *Emticicia* y *Rumella* en el aspirado bronquial; y *Axonexus*, *Herbaspirillum*, *Peredibacter*, *Simplicispira*, *Sporolactobacillus*, y *Methylobacillus* en el lavado broncoalveolar.

Figura 4. Diagrama de Venn de los géneros bacterianos únicos y/o compartidos entre los diferentes tipos de muestra. Una lista completa de géneros para cada ubicación en el diagrama se incluye en el Anexo 3.1 Abreviaturas: Sp (esputo), Ts (tejido), BAL (lavado broncoalveolar), BAs (aspirado bronquial).

3.4. Discusión

Este capítulo ha analizado el microbioma del árbol bronquial en pacientes con EPOC estable y con un deterioro moderado de la función pulmonar, a través de la amplificación y la pirosecuenciación del gen ribosómico 16S ARNr. Hemos caracterizado la microbiología de los diferentes compartimentos del árbol bronquial (superior e inferior), mediante el examen de diferentes muestras respiratorias como esputo, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar, y la mucosa bronquial (biopsia). Las curvas de rarefacción e índices de diversidad como Chao1 mostraron un número de 80 a 140 géneros de bacterias por paciente, con una diversidad total estimada de más de 500 especies en las muestras examinadas. El número de especies potenciales en las muestras respiratorias podría estar sobrestimado debido a errores en la secuenciación (Quince C. y col. 2009) y por la corta longitud de las secuencias, atribuibles únicamente a la cobertura de las regiones hipervariables V1 y V2 del gen ribosómico 16S ARNr. La asignación taxonómica a niveles como género o familia es altamente fiable en esta longitud de lecturas (Liu Z. y col. 2008) y confirma la presencia de una comunidad bacteriana compleja. Por lo tanto, la diversidad bacteriana en las vías respiratorias inferiores, al menos en los pacientes EPOC sin signos de infección, es mucho mayor de lo previsto. Amplificamos a nivel de phylum en estos pacientes *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*, y a nivel de género *Streptococcus*, *Prevotella*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium* y *Neisseria* siendo los géneros bacterianos más comunmente identificados, que en conjunto representan el 60% del número total de secuencias. La diversidad bacteriana fue menor en el esputo, un tipo de muestra que alcanza la saturación en alrededor de 60 géneros de bacterias, y mucho más alto en el lavado broncoalveolar y muestras de mucosa bronquial. Los microbiomas de estas muestras del árbol bronquial inferior mostraron gran similitud, mientras que esputo y aspirado bronquial fueron distintas entre ellas y de las muestras de las vías bajas.

Los estudios basados en cultivos tradicionales del árbol bronquial lo han descrito como medio estéril en sujetos sanos (Li W. y Godzik A. 2006; Rosell A. y col. 2005; Thorpe JE. y col. 1987). Así, se han recuperado bacterias a partir de secreciones bronquiales sólo cuando el paciente sufre de una enfermedad respiratoria crónica. En ausencia de signos o síntomas de infección respiratoria, microorganismos potencialmente patógenos colonizan con baja carga bacteriana, encontrándose a menudo en el árbol bronquial de los pacientes con EPOC (Marin A. y col. 2010; Marin A. y col. 2012; Rosell A. y col. 2005), y estando la forma de recuperar microorganismos en la EPOC abierta a debate. Las técnicas microbiológicas cultivo-independiente han demostrado que los pulmones no son estériles en condiciones de salud y se han documentado cambios en el microbioma pulmonar en varias

enfermedades pulmonares crónicas (Armougom F. y col. 2009). Charlson y colaboradores han estudiado las secreciones de la orofaringe y bronquios en sujetos sanos, buscando similitudes en el patrón microbiológico que se encuentra en la orofaringe y el árbol bronquial, con una biomasa menor en las secreciones bronquiales, y se llegó a la conclusión que el microbioma bronquial específico en sujetos sanos no existe (Charlson ES. y col. 2011). Un patrón diferente se informó por Hilty y colaboradores en los pacientes con EPOC (Hilty M. y col. 2010). Estos autores compararon las secreciones bronquiales inferiores recuperados por el cepillado bronquial de sujetos sanos y pacientes con EPOC y asma, demostrando una recuperación frecuente de los miembros del filo *Proteobacteria*, que contenía importantes microorganismos potencialmente patógenos como *Haemophilus* y *Moraxella*. Erb-Downward y colaboradores (Erb-Downward JR. y col. 2011) utilizaron un enfoque similar en los fumadores sin alteraciones funcionales y con EPOC mediante lavado broncoalveolar, encontrando una gran similitud en el microbioma de los fumadores con o sin enfermedad, mostrando los siguientes phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Fusobacterias* en más de la mitad de los pacientes y una diversidad similar, siendo *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Veillonella* y *Porphyromonas* los géneros más comúnmente identificados. Estos autores también encontraron un perfil diferente con una sobre-representación del género *Pseudomonas*, en pacientes con EPOC grave, cuando se examinaron las biopsias de la mucosa bronquial obtenida a partir de muestras quirúrgicas (Erb-Downward JR. y col. 2011). Una limitación importante de los estudios realizados en pacientes con EPOC es que la diversidad microbiana en los diferentes compartimentos bronquiales no se ha evaluado, lo que dificulta la interpretación de los resultados.

Nuestro estudio se centró en pacientes con EPOC moderada y confirmó que en ausencia de signos y síntomas de infección bronquial existe una rica variedad bacteriana en el árbol bronquial, siendo los phyla más comúnmente amplificados *Proteobacteria*, *Bacteroidia*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*, los cuales se encuentran también en sujetos sanos (Charlson ES. y col. 2011). En las muestras estudiadas, los géneros bacterianos más comúnmente amplificados han sido *Streptococcus*, *Fusobacterium* *Prevotella* y *Neisseria*, también detectados en la población normal (Charlson ES. y col. 2011), y *Moraxella*, *Haemophilus*, y *Acinetobacter*, las bacterias que han aparecido sobre-representados en los pacientes con EPOC (Erb-Downward JR. y col. 2011; Hilty M. y col. 2010). Por consiguiente, nuestros datos apoyan la hipótesis de que en pacientes con EPOC el microbioma bronquial incluye géneros presentes en sujetos sanos, con un aumento de la presencia adicional de diversos géneros como *Haemophilus* y *Moraxella* que son inusuales en la población normal y se incluyen como microorganismos potencialmente patógenos.

Las muestras de las vías respiratorias superiores, esputo y aspirado bronquial, mostraron una baja diversidad y el hallazgo de filos que forman parte de la microbiota orofaríngea de los sujetos sanos, como *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Charlson ES. y col. 2011). Muestras del árbol bronquial inferior (lavado broncoalveolar y las muestras de biopsia bronquiales) mostraron un microbioma más diverso, con una representación menor de flora orofaríngea, y la recuperación de géneros que se incluyen como microorganismos potencialmente patógenos. Estos resultados confirman que el árbol bronquial tiene diferentes compartimentos con características específicas en la EPOC. El árbol bronquial superior tiene una baja diversidad y una sobre-representación de flora orofaríngea; por contra el árbol bronquial inferior muestra una mayor diversidad que no incluye géneros usuales en el esputo y aspirados.

En el esputo se encuentra un nivel inferior de biodiversidad bacteriana en comparación con otros tipos de muestras, lo cual sugiere que las muestras de esputo contienen una fracción limitada de la comunidad total de bacterias que habitan el tracto respiratorio. Además, el PCoA indica que las muestras de esputo, que se utilizan comúnmente para la identificación de bacterias en infecciones de las vías respiratorias, no son representativas de la composición y proporción de taxones bacterianos en la mucosa bronquial. El lavado broncoalveolar, por otra parte, mostró una diversidad similar pero ligeramente superior al de la mucosa, probablemente atribuible a una superficie bronquial más ampliamente muestreada por el lavado, considerándose como un buen sustituto representativo de muestras de mucosa bronquial (Figura 1B). La representatividad de los métodos de muestreo es un problema común en la investigación del microbioma humano. La mayoría de los estudios de la diversidad microbiana en el tracto gastrointestinal, por ejemplo, se han realizado en muestras de heces, pero se ha encontrado una composición bacteriana muy diferente en la mucosa intestinal (es decir, muestras de biopsia) en comparación con las muestras de heces de los mismos individuos (Durbán A. y col. 2011), cuestionando la validez de muchos estudios de metagenómica del intestino humano y animal. Problemas similares se han denunciado en muestras orales, donde las muestras de saliva se usan de forma frecuente en estudios etiológicos y epidemiológicos de enfermedades orales, sin ser representativas de las comunidades microbianas que causan la caries o la periodontitis en los tejidos afectados (Simón-Soro A. y col. 2013). Del mismo modo, el uso de muestras inadecuadas para el estudio de la diversidad bacteriana de las vías aéreas puede tener importantes implicaciones clínicas. Dado que las muestras de esputo son probablemente las muestras clínicas pulmonares más comúnmente utilizadas, ya que se obtienen fácilmente con técnicas no invasivas, debe tenerse en cuenta que la microbiota del esputo no es representativa de la microbiología de las vías respiratorias inferiores.

Así, por ejemplo, no detectamos *Legionella* en el esputo, que se halló en cuatro de las seis muestras de lavado broncoalveolar. El papel de las bacterias atípicas como la *Legionella* en la EPOC no es clara y se debe estudiar más a fondo, ya que otros autores han detectado *Legionella* en pacientes con EPOC mediante métodos de PCR (Curran T. y col. 2010).

Por último, se debe hacer hincapié en que, aunque no podemos descartar que la puesta en común de algunos géneros de bacterias entre las muestras del árbol bronquial superior y la cavidad oral se puede atribuir en parte a cierta contaminación bacteriana en el momento del muestreo (Charlson ES. y col. 2011), la semejanza observada también puede tener un significado biológico. La laringe clásicamente ha sido considerada como una barrera entre la orofaringe y la tráquea, lo que mantendría el último estéril. Sin embargo, los datos presentados aquí sugieren que las bacterias de la cavidad oral y la faringe también se encuentran en el árbol bronquial, no evitando la barrera mecánica la entrada regular de la microbiota orofaríngea a la parte superior de los bronquios, disminuyendo según se baja a la parte inferior de las vías respiratorias, al nivel en el que se realiza el lavado broncoalveolar. Esperamos que estos resultados estimulen la caracterización adicional de la microbiota del tracto respiratorio en controles sanos y en individuos con diferentes enfermedades respiratorias.

III.

Capítulo 4.

El microbioma de la leche materna

4.1 Introducción

La leche materna obtuvo su superioridad nutricional después de la divergencia de los mamíferos hace millones de años (Ofstedal O.T. y col. 2002). Varios componentes incorporados en el calostro y la leche humana madura son considerados protectores y complementan la inmunidad innata, ayudando a crear un microambiente adecuado para el desarrollo y maduración intestinal (Petherick A. 2010; Walker A. y col. 2010). La protección se realiza por componentes, incluyendo citoquinas reguladoras y factores de crecimiento que guían el desarrollo inmunológico. La leche materna contiene otros factores como la lisozima, lactoferrina, y oligosacáridos, que ayudan en la prevención de infecciones y que apoyan el crecimiento de las bacterias beneficiosas. Además, la leche materna también es una fuente continua de microbios, factores de crecimiento, y componentes que regulan las interacciones huésped-microbio (Donovan SM. y col 2012; Steele-Mortimer O. y Subtil A. 2014). Estos factores hacen hincapié en la posición clave de la lactancia materna para conferir protección durante un período crítico en la vida, cuando la leche materna es la única fuente de nutrición del lactante y cuando las propias defensas inmunitarias del neonato, incluyendo la integridad de la barrera intestinal, son inmaduros (LeBouder E. y col. 2006; Brandtzaeg P. y col. 2009; Stockinger S. y col. 2011; Hoppu U. y col. 2012).

Se ha constatado que la lactancia materna modifica el desarrollo de la microbiota intestinal del lactante (Gronlund MM. y col. 2007; Martín R. y col. 2009; Roger LC. y col. 2010). Además, la leche materna es reconocida como uno de los elementos más importantes en la modulación inmunológica posparto, y está estrechamente relacionada con la salud del niño (Aaltonen J. y col. 2011). En el caso de las mujeres embarazadas con sobrepeso, se puede generar un círculo vicioso de desarrollo metabólico desfavorable si la inapropiada microbiota intestinal asociada con el aumento de peso o sobrepeso excesivo durante el embarazo se transfiere al lactante (Kalliomaki M. y col. 2008; Collado MC. y col. 2008; Collado MC. y col. 2010; Dominguez-Bello MG. y col. 2010). Las diferencias en la composición de la microbiota en niños nacidos por cesárea en comparación con los bebés nacidos por vía vaginal (Dominguez-Bello MG. y col. 2010; Huurre A. y col. 2008) sugieren que se produce una transmisión materno-infantil de la microbiota vaginal durante el parto. Sin embargo, trabajos recientes han abierto nuevas perspectivas en el descubrimiento de una fuente previamente desconocida en la transmisión de microorganismos al recién nacido, como es la microbiota de la leche materna (Hunt KM. y col. 2011), lo que sugiere que factores maternos pueden influir en la composición y la actividad de la microbiota. Sin embargo, los trabajos sobre la microbiota de la leche materna mediante estudios moleculares son escasos, y no existen aproximaciones de secuenciación masiva que determinen los cambios en el microbioma de la leche a lo largo del tiempo o debido a otros factores como el tipo de parto o la salud de la madre, además de no conocer su composición en las fases más iniciales como el calostro, cuando la posible contaminación externa es menos probable. El propósito del presente estudio es por tanto identificar factores prenatales y postnatales que puedan influir potencialmente en las comunidades bacterianas que habitan en la leche humana y comparar la composición bacteriana de la leche materna con la de otros sitios en el cuerpo humano. Para este propósito, se analizó mediante pirosecuenciación la composición de la leche humana a través del período recomendado de la lactancia materna en mujeres que variaban en índice de masa corporal y en ganancia de peso durante el embarazo, así como en el tipo de parto.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1. Diseño del estudio y obtención de muestras.

Las madres fueron seleccionadas a partir de un estudio prospectivo y aleatorizado, iniciando el seguimiento en abril de 2002 (NCT00167700, apartado 3, registrados a través de clinicaltrials.gov)

(Laitinen K. y col. 2009). Las mujeres embarazadas fueron reclutadas en su primera visita a la clínica si no tenían enfermedades metabólicas o crónicas que no fueran alérgicas. Para el presente informe fueron seleccionadas en función de su índice de masa corporal (IMC) antes del embarazo, las prácticas tempranas de lactancia materna exclusiva y de que la lactancia materna durase al menos 6 meses durante el seguimiento, así como la disponibilidad para tomar las muestras. Un total de 18 mujeres fueron incluidas: 10 mujeres obesas con un IMC (en kg/m²) > 30 y 8 mujeres de peso normal con un IMC mayor o igual a 25 que sirvieron como controles. Los detalles de la entrega y la alimentación infantil se tomaron después del nacimiento. Los datos sobre la duración de la lactancia materna y las prácticas de alimentación infantil se obtuvieron a través de entrevistas y se registraron en cada visita. La orientación alimentaria materna fue proporcionada por un especialista en nutrición en cada visita del estudio para cumplir con las recomendaciones dietéticas. El consentimiento informado firmado se obtuvo de los participantes, y el Comité de Ética del Hospital de Distrito del Sur-Oeste Finlandés aprobó el protocolo del estudio. El aumento de peso normal se define de acuerdo con el Instituto de las recomendaciones de medicina: 7.0 a 11.5 kg y 11,5 a 16.0 kg para el peso normal y obesos respectivamente. Las características clínicas de las madre e hijos se muestran en la Tabla 1 (Anexo 4.1).

Las muestras de leche materna fueron recogidas dentro de los 2 días después de que las madres dieran a luz en el hospital de maternidad (calostro) y en 1 y 6 meses después del parto, en el domicilio familiar. A las madres se les dio instrucciones escritas para la recogida estandarizada de las muestras por la mañana, y éstas fueron congeladas y almacenadas a -20°C para su posterior análisis. Antes de la recolección de la muestra, la madre se limpió con un hisopo de yodo para reducir las bacterias que residen en la piel, recogándose la leche materna manualmente, desechando las primeras gotas y depositándola en un tubo de 15 ml autoclavado.

4.2.2 Extracción de ADN.

Las muestras de leche correspondientes al calostro, 1 y 6 meses de edad del lactante se descongelaron y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos para separar las células y la grasa de suero de leche y se concentraron diez veces. El ADN total fue entonces aislado utilizando el Kit de ADN QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania). Este ADN se utilizó para la pirosecuenciación.

4.2.3. Amplificación por PCR y pirosecuenciación.

Las primeras 500 pares de bases (pb) de los genes 16S ARNr fueron amplificados con los cebadores universales eubacterianos 27F (5'-AGAGTTTGTGATCMTGGCTCAG-3') y 533R (5'-TTACCGCGGCKGCTGGCACG-3') mediante el uso de la polimerasa de alta fidelidad de AB-Gene (Thermo Scientific) con una temperatura de hibridación de 52°C y 20 ciclos totales en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para reducir al mínimo los sesgos de amplificación (Sipos R. y col. 2007). Posteriormente se realizó una segunda amplificación utilizando el producto de PCR purificado anteriormente como molde, en el que se modificaron los cebadores universales para contener los adaptadores de pirosecuenciación A y B más un "código de barras" de 8-pb específico para cada muestra, siguiendo el método utilizado en Benítez-Páez A. y colaboradores, 2013. Los códigos de barras difieren unos de otros en al menos 3 nucleótidos para evitar errores en la asignación a la muestra. Tres PCR secundarias se realizaron por muestra; los productos de PCR se agruparon antes de la purificación mediante el uso del kit Ultrapure PCR Purification (Roche). El DNA final por muestra se midió por fluorescencia mediante el fluorímetro Modulus 9200 de Turner Biosystems. Los Productos de PCR fueron secuenciados por el extremo del cebador directo mediante el secuenciador GS-FLX con la química Titanium (Roche) en el Centro de Investigación en Salud Pública de Valencia, España. Se usó un octavo de placa para cada grupo de 20 muestras.

4.2.4. Análisis de secuencias.

Las lecturas con un valor promedio de calidad inferior a 20 y/o con más de cuatro ambigüedades en las regiones homopoliméricas en los primeros 360 flujos fueron excluidos del análisis. Sólo las lecturas con más de 200 pb se consideraron para el estudio, ya que se ha demostrado que la precisión de asignación taxonómica disminuye dramáticamente en lecturas más cortas de 200 pb, eliminando el posible motivo de un elevado índice de diversidad (Claesson MJ. y col. 2010). Posteriormente se filtraron todas las lecturas por el software de Bellerophon (Huber T. y col. 2004) eliminando así posibles quimeras. Las secuencias fueron asignados a cada muestra mediante el código de barras de 8 pb, y pasadas por el clasificador Ribosomal Database Project (RDP) (Cole JR. y col. 2009), asignándose cada lectura a un filo, clase, familia y género, siempre y cuando la asignación taxonómica fuera inequívoca en un 80% de umbral de confianza, siendo este umbral el que asegura que la asignación de cada lectura tiene una precisión >95% a estos niveles taxonómicos. Para estimar la diversidad total, las secuencias se agruparon al 97%, 95%, y 90% de identidad en nucleótidos sobre el

90% de la longitud de la alineación de la secuencia utilizando el software CD-HIT (Li W. y Godzik A. 2006), y las curvas de rarefacción se obtuvieron con el programa analítico aRarefaction 1.3 (Holland SM. 2003). Para este análisis, las secuencias >97% de identidad se consideraron unidades taxonómicas operacionales (OTU), representando este grupo de lecturas la aproximación consenso para la misma especie (Sogin y col. 2006). Los análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizaron con UniFrac (Lozupone C. y col. 2006) mediante la agrupación en un 97% de identidad de las secuencias con la opción de análisis ponderado, que compara la diversidad estimada con un enfoque filogenético, teniendo en cuenta tanto las lecturas asignadas taxonómicamente, como las no asignadas.

4.3 Resultados

4.3.1. Diversidad bacteriana de la leche a través del tiempo de lactancia.

Después de filtrar por calidad y longitud de corte, se obtuvieron un total de 119.652 secuencias del gen ribosómico 16S ARNr, con un número medio de secuencias de alta calidad por muestra de 2623. La asignación taxonómica de las secuencias mostró que la composición de la leche materna humana está dominada por la clase *Bacilli*, que representan más del 76% del número total de las secuencias obtenidas (Figura 1A). En el calostro, los géneros más comunes fueron *Weissella* y *Leuconostoc* (ambas bacterias ácido lácticas del orden *Lactobacillales*) seguido de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* (Figura 1B). Aunque los géneros de bacterias del ácido láctico están todavía entre los más abundantes durante el primer y el sexto mes en las muestras de leche materna, aumentaban significativamente habitantes típicos de la cavidad oral, tales como *Veillonella*, *Leptotrichia*, y *Prevotella* o el filo TM7, también presente en el ambiente oral (Belda-Ferre P. y col. 2012). El calostro, en comparación con las muestras de leche del sexto mes, mostró diferentes patrones de diversidad bacteriana. Las curvas de rarefacción indican más de 1000 OTUs cuando las secuencias se agruparon en un 97% de identidad de secuencia (el valor consenso para determinar el número de especies) (Figura 2), mostrando una diversidad mayor cuando el parto es mediante cesárea programada, y no han intervenido las causas naturales en el parto. Aunque la longitud de secuencia que proporciona la tecnología (400-pb de longitud media) y los posibles errores de pirosecuenciación pueden inflar los valores de diversidad (Quince C. y col. 2009), los datos sugieren que varios cientos de especies están presentes en la leche materna humana, con el calostro mostrando una ligera mayor diversidad que la leche de transición y la leche madura.

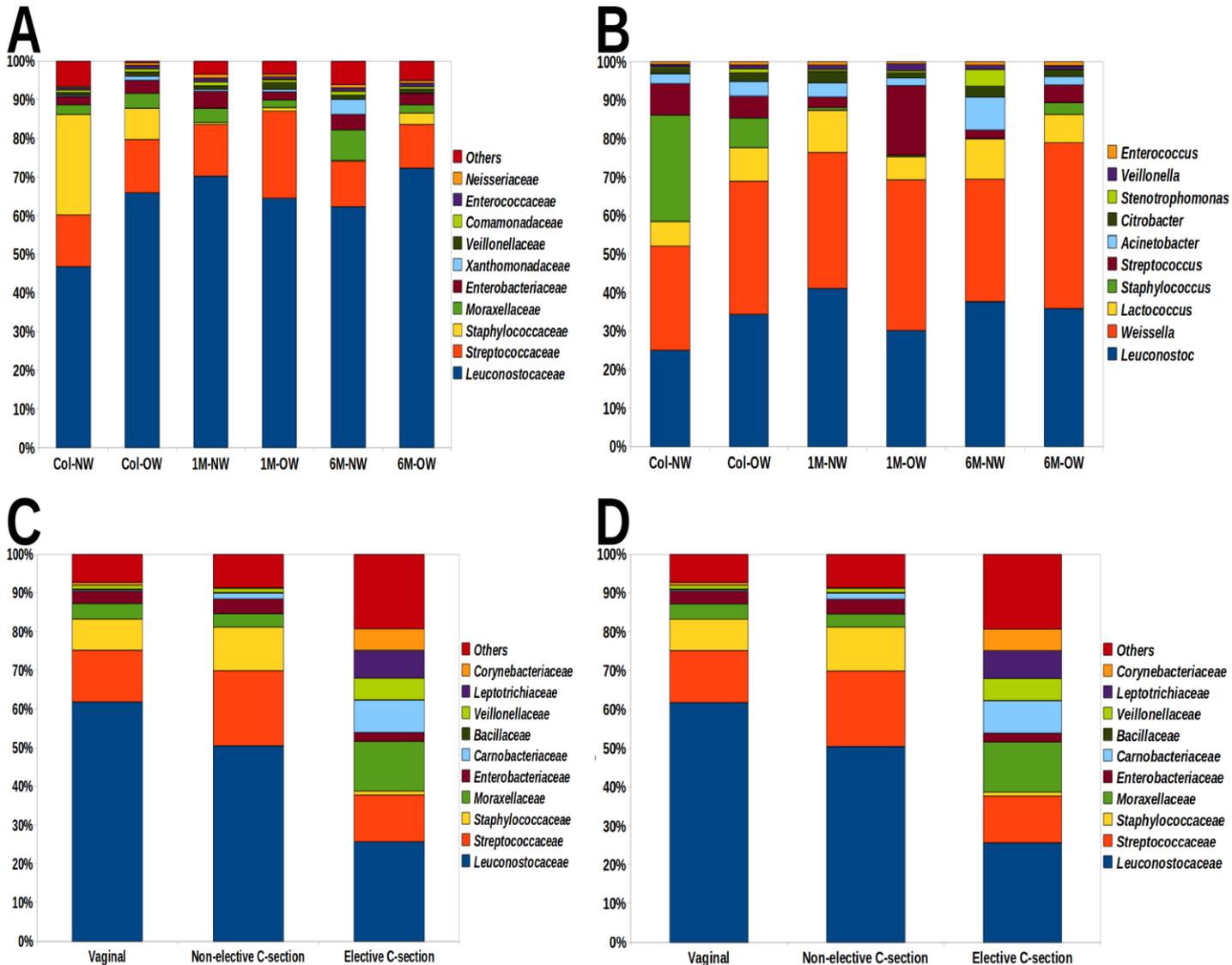


Figura 1. Composición taxonómica bacteriana de la leche materna humana. Los gráficos muestran el porcentaje de familias bacterianas (izquierda) y géneros (a la derecha). A y B: composición bacteriana de la microbiota de la leche materna a través del tiempo (el calostro, 1 y 6 meses después del parto) en peso normal (n=8) y en madres obesas (n=10). C (muestras de calostro) y D (muestras de leche durante el período de lactancia): la composición bacteriana de la leche de las madres que dieron a luz por vía vaginal (n=9) y no programada (n=3) y cesárea programada (n=6). Col-NW, muestras de calostro de madres con peso normal; Col-OW, muestras de calostro de madres obesas, C-section, muestras de cesárea; 1M-NW, muestras de leche del primer mes de lactancia materna en las madres de peso normal; 1M-OW, muestras de leche del primer mes de lactancia materna en madres obesas; 6M-NW, muestras de la leche del sexto mes de la lactancia materna en las madres de peso normal; 6M-OW, muestras de leche del sexto mes de la lactancia materna en madres obesas.

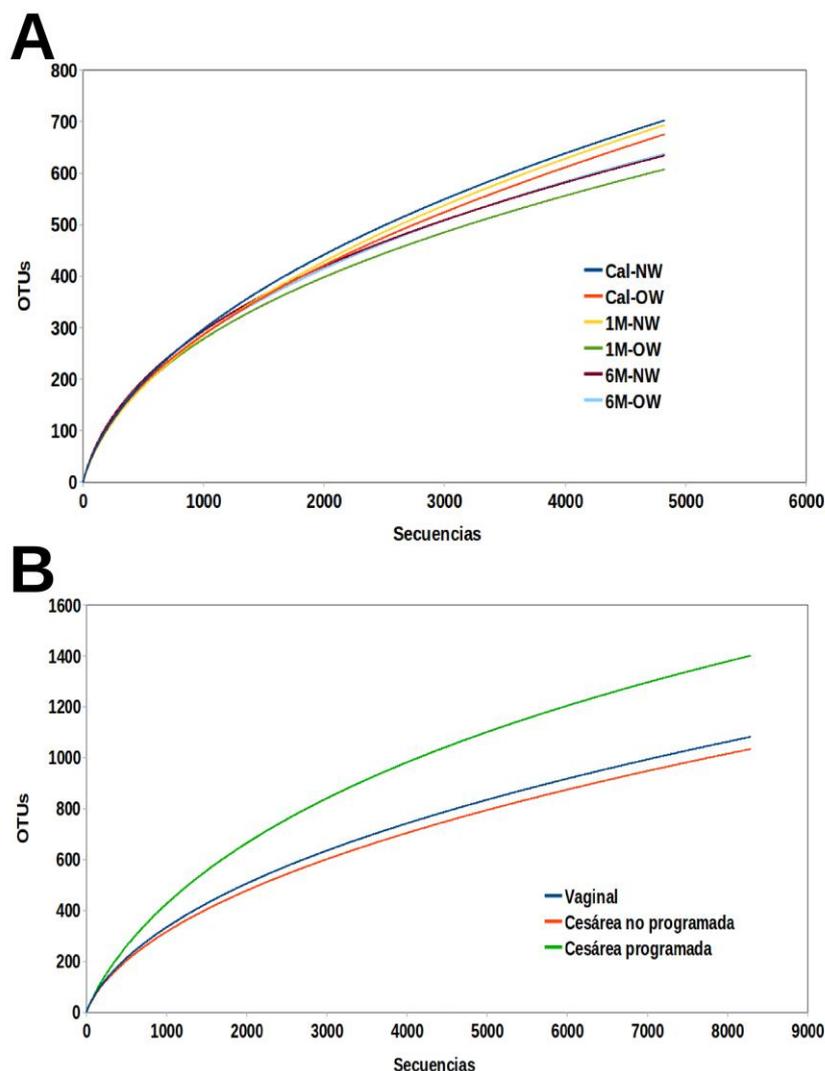


Figura 2. Diversidad microbiana de la leche materna. Los gráficos muestran las curvas de rarefacción, que relacionan el esfuerzo de secuenciación en comparación con una estimación del número de especies bacterianas, inferido por el número de OTUs. Un OTU es un grupo de secuencias de 16S ARNr que son > 97% idénticos establecido como el porcentaje de identidad para pertenecer a la misma especie para las secuencias completas de este gen. La parte A muestra las curvas de rarefacción de las muestras de leche a través del tiempo (calostro, primer y sexto mes después del parto) de madres con peso normal y obesas. La parte B muestra las curvas de rarefacción de los 3 diferentes tipos de parto estudiados. Col-NW, muestras de calostro de madres con peso normal; Col-OW, muestras de calostro de madres obesas, C-section, muestras de cesárea; OTUs, unidades taxonómicas operacionales; 1M-NW, muestras de leche del primer mes en madres de peso normal; 1M-OW, muestras de leche del primer mes en madres obesas; 6M-NW, muestras de leche materna del sexto mes en madres de peso normal; 6M-OW, muestras de leche materna al sexto mes en madres obesas.

4.3.2. Influencia del peso en la microbiota de la leche materna.

El IMC materno influyó en la composición de la microbiota de la leche. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para las muestras de leche de las madres que habían dado a luz a sus bebés por vía vaginal para eliminar otros factores que no fueran el factor peso. La agrupación de las muestras en las mujeres obesas indica una composición bacteriana más homogénea en comparación con las muestras de leche de las mujeres de peso normal, que están más dispersas (Figura 3A), lo que sugiere que la composición bacteriana puede haber sido influenciada por el peso corporal. Además, el análisis del tercer componente del PCoA claramente separa las muestras de madres obesas (valores positivos del eje Y) respecto a las madres con peso normal (Figura 3B). Respecto al aumento de peso durante el embarazo, se observó que las madres con un aumento de peso excesivo durante el embarazo mostraron una composición bacteriana distinta en comparación de aquellas con un aumento de peso

normal, indicado por la separación de estas muestras en valores negativos y positivos del componente principal (Figuras 3C y 3D).

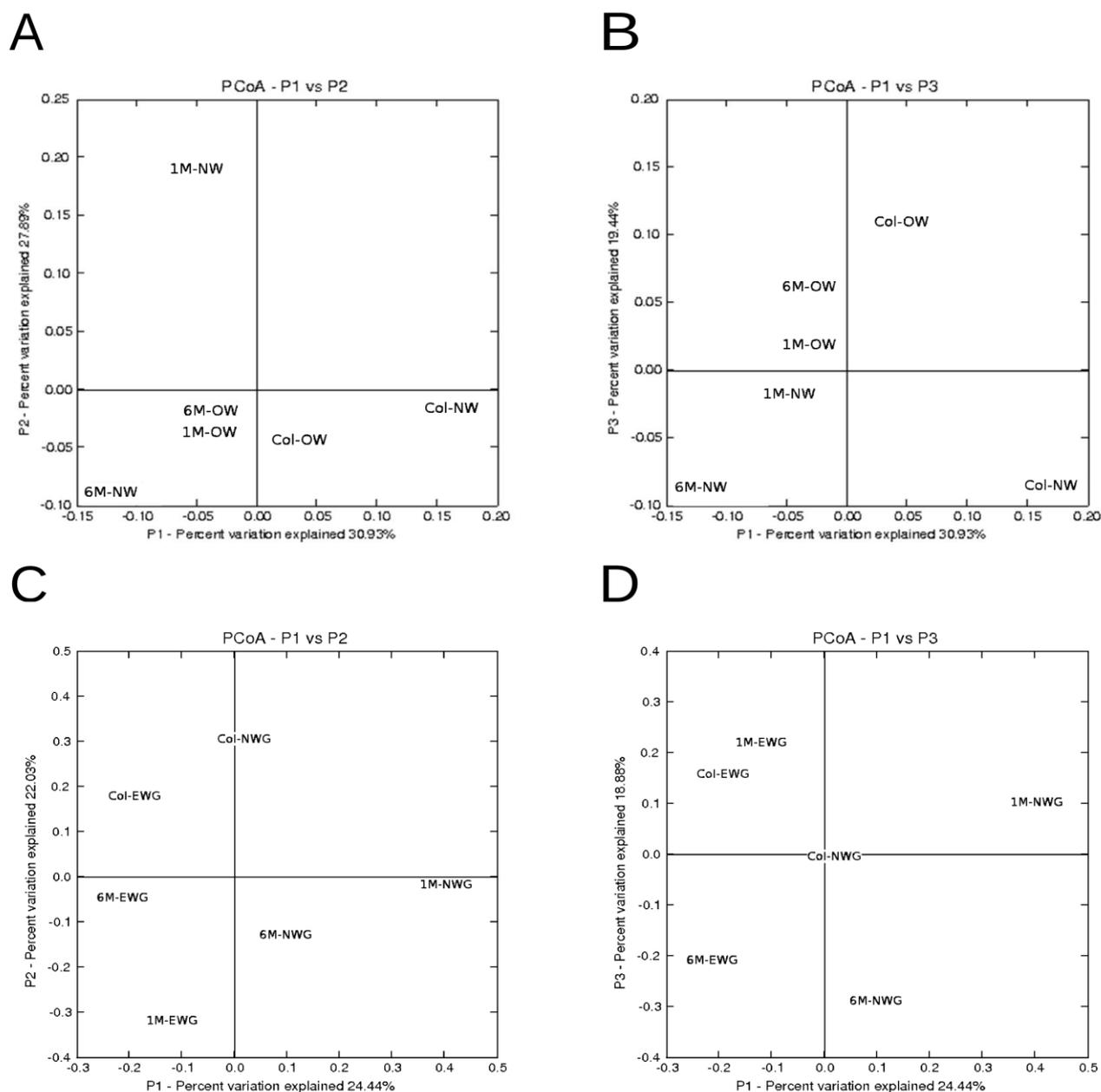


Figura 3. PCoA sobre la composición bacteriana de la leche materna humana. A-B: Distribución de calostro y muestras del primer y sexto mes de madres obesas y de peso normal. C-D: Distribución de calostro y muestras del primer y sexto mes de las madres con un aumento de peso normal y excesivo durante el embarazo. Todas las muestras se obtuvieron de las madres que dieron a luz por parto vaginal (n=9). Col-EWG, muestras de calostro de madres con ganancia excesiva de peso; Col-NW, muestras de calostro de madres con peso normal; Col-NWG, muestras de calostro de madres, con aumento de peso normal; Col-OW, muestras de calostro de madres obesas; NW, madres de peso normal; OW, madres obesas; P, componente principal de coordenadas; PCoA, análisis de coordenadas principales; las muestras de leche 1M-EWG corresponden al primer mes de lactancia materna en las madres con ganancia excesiva de peso; 1M-NW, muestras de leche materna del primer mes de lactancia materna en madres de peso normal; 1M-NWG, muestras de leche materna del primer mes de la lactancia materna en madres de aumento de peso normal; 1M-OW, muestras de leche del primer mes de la lactancia materna en madres obesas; 6M-EWG, las muestras del sexto mes de lactancia materna en madres con ganancia excesiva de peso; 6M-NW, muestras al sexto mes de lactancia materna en madres de peso normal; 6M-NWG, muestras al sexto mes de lactancia materna con ganancia de peso normal; 6M-OW, muestras al sexto mes de lactancia materna en madres obesas.

4.3.3. Influencia del tipo de parto en la microbiota de la leche materna.

Con el fin de detectar los factores potenciales que podrían afectar a la composición bacteriana de la leche, en los datos de las voluntarias se recogieron datos como el tipo de parto, si éste había sido por vía vaginal o por cesárea y en ausencia/presencia de anestesia (ver datos clínicos en la Tabla 1, anexo 4.1). Se detectó una diferencia notable en la composición taxonómica de bacterias entre las madres que dieron a luz por vía vaginal o por cesárea de emergencia respecto a las madres que dieron a luz por cesárea programada. Las madres que dieron a luz por cesárea programada mostraron un cambio significativo de la composición, con cantidades reducidas de *Leuconostocaceae* y un aumento en las proporciones de *Carnobacteriaceae*, entre otros, en comparación con aquellas madres que dieron a luz por vía vaginal (Figura 1, C y D). Esta diferencia ya estaba presente en el calostro y se mantuvo en la leche materna del primer y sexto mes.

Un análisis de coordenadas principales (PCoA) de las muestras en comparación con la microbiota de otros nichos humanos revela que las muestras de leche procedentes de madres que dieron a luz por cesárea programada, contenían una composición bacteriana sesgada como resultado de la influencia del modo de parto, agrupándose con muestras de la mucosa oral y vaginal (Figura 4), lo que sugiere que el mecanismo de transferencia bacteriana podría estar modificado. Además muestra que la composición bacteriana de la leche materna en condiciones de parto vaginal está claramente diferenciada de las muestras de otros nichos humanos, siendo por tanto una microbiota característica.

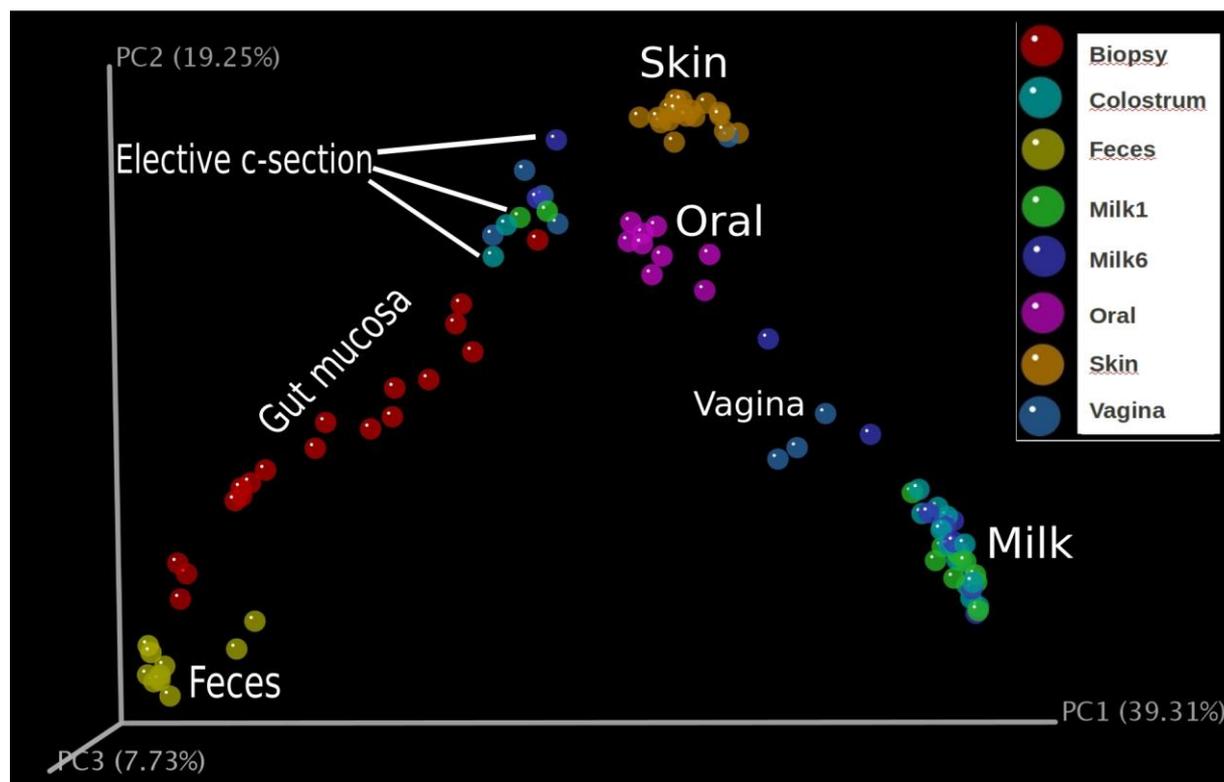


Figura 4. Relación entre la composición de las bacterias de la leche y el resto del microbioma humano. El gráfico muestra un PCoA de la composición bacteriana de la leche del primer y sexto mes y calostro en comparación con las secuencias disponibles de mujeres adultas con la misma región del gen ribosómico 16S ARNr (regiones hipervariables V1 y V2) como son la piel, la vagina, las heces, la mucosa intestinal, y el epitelio oral. Las muestras de leche en los 3 puntos de tiempo se agrupan y aparecen por separado del resto de muestras, a excepción de la leche procedente de madres que dieron a luz por cesárea programada, que se solapan con las muestras orales. Los datos del microbioma humano provienen de muestras fecales (Turnbaugh PJ . y col. 2009); de la piel, la vagina, muestras orales (Dominguez-Bello MG . y col. 2010), y de biopsias de la mucosa intestinal (Durban A . y col. 2012). C-section, parto por cesárea; Milk1, leche del primer mes; Milk6, leche del sexto mes; PC1, PC2 y PC3, primer, segundo y tercer componente del análisis de componentes principales.

4.4 Discusión

Los resultados de este estudio proporcionan nueva información sobre la composición de la microbiota en la leche materna. La leche materna proporciona componentes bioactivos que directa e indirectamente mejoran la función de la barrera de la mucosa y el desarrollo inmunológico (Brandtzaeg P. y col. 2009; Stockinger S. y col. 2011). Entre estos componentes, nuestro trabajo muestra un conjunto extraordinariamente diverso de microorganismos cuyo papel funcional debe ser evaluado. Los datos también indican cambios significativos en la composición de la microbiota de la leche a través del tiempo de lactancia de una manera análoga a lo que ocurre para el contenido de proteínas o grasas, en este caso para adaptarse a las necesidades del lactante (Hoppu U. y col. 2012). Las diferencias en diversidad y composición bacteriana entre nuestros datos y otros ahora disponibles (Anexo 4.2) podría

ser el resultado de las diferencias geográficas, ambientales o de dieta en las madres, o por las diferencias en el protocolo experimental (por ejemplo, el uso de cebadores no degenerados, una temperatura de hibridación alta, y un número elevado de ciclos en la PCR del estudio de madres de Idaho, EEUU [Hunt KM. y col. 2011]), que en su conjunto puede reducir y sesgar la diversidad encontrada. Por tanto, se hace necesario estandarizar las condiciones de PCR en los diversos estudios, así como ampliar los grupos geográficos a testar para poder determinar si la composición microbiana de la leche materna es o no variable entre poblaciones humanas.

En nuestras muestras, el primer y segundo componente del PCoA indican que las muestras de calostro están separadas de las de primer y sexto mes (Figura 3A y 3B, respectivamente), lo que indica que el calostro inicial es de composición distinta a la leche de transición y madura. Hay que recordar que, aunque la pirosecuenciación del gen 16S ARNr permite un extraordinario grado de detalle en el análisis de la diversidad microbiana, este enfoque tiene sus limitaciones, tales como los sesgos de amplificación por PCR (Sipos R. y col. 2007). Este sesgo de amplificación es bien conocido en algunos grupos de bacterias que no son fácilmente amplificados por cebadores universales, como las bifidobacterias, que son un sello distintivo de la microbiota intestinal en los lactantes sanos (Martín R. y col. 2009). Por lo tanto, también se realizaron experimentos de qPCR (llevados a cabo por la Dra. M. Carmen Collado) utilizando cebadores para amplificar los grupos taxonómicos específicos (Cabrera-Rubio R. y col. 2012), incluyendo taxones tales como bifidobacterias cuyo alto contenido de G+C desfavorece la amplificación bajo condiciones estándar.

Nuestros resultados muestran que el IMC materno y el aumento de peso durante el embarazo tienen un impacto en la microbiota de la leche materna a nivel de composición taxonómica y diversidad. Las muestras de calostro y del primer mes de leche materna de madres obesas mostraron una menor diversidad que aquellas muestras de madres de peso normal, aunque la diferencia desapareció en muestras de leche tomadas a los 6 meses (Figura 2). La relación entre la microbiota intestinal y la obesidad podría extenderse también entre la madre y el bebé en mujeres con un alto peso corporal antes del embarazo y/o un aumento de peso excesivo durante el mismo, pues su composición bacteriana alterada podría actuar como un inóculo para la microbiota intestinal en los lactantes (Aaltonen J. y col. 2011; Kalliomaki M. y col. 2008). Es importante destacar que el tamaño de la muestra (18 madres) limita la interpretación de los resultados, y las tendencias sugeridas deben ser confirmadas por estudios de mayor tamaño poblacional. Dado que las bacterias de la leche están entre las primeras transferidas al tracto oro-gastrointestinal del bebé, una composición sesgada en la leche

podría ser un factor que contribuye a adquirir cambios en la composición bacteriana de las madres a lactantes. Por lo tanto, nuestros datos pueden indicar un mecanismo adicional que explica el mayor riesgo de obesidad en los niños de madres obesas o con sobrepeso.

En los países industrializados se está experimentando un aumento progresivo en enfermedades inmunológicas y metabólicas, siendo la velocidad de este aumento especialmente notable en los niños. Se ha constatado que el tipo de parto influye en la composición de la microbiota intestinal neonatal (Dominguez-Bello MG. y col. 2010; Huurre A. y col. 2008). Nuestros datos indican, además, que la leche materna de las madres que dieron a luz por cesárea programada mostró un cambio de composición significativo en comparación con aquellos que tenían una cesárea no programada o aquellas que dieron a luz vía vaginal (Figura 1C y 1D; Figura 4). La diferencia ya estaba presente en el calostro y se mantuvo en la leche materna del primer y sexto mes, lo que indica que el cambio en la composición bacteriana tenía un efecto a largo plazo. El hecho es que la microbiota de la leche de las madres que dieron a luz por cesárea no programada (de emergencia) tenían una composición microbiana comparable a la de la leche materna de las madres que dieron a luz por vía vaginal, sugiriendo que los cambios fisiológicos (por ejemplo, hormonales), de estrés o físicos producidos en la madre durante el parto pueden influir en la composición de la comunidad bacteriana. Dado el aumento de enfermedades como la rinitis alérgica, el asma y la enfermedad celíaca en niños nacidos por cesárea (Thavagnanam S. y col. 2008; Decker E. y col. 2010), sería deseable una evaluación de los posibles efectos de la composición bacteriana de la leche materna sobre el desarrollo del sistema inmune.

Es motivo de debate que las fuentes de colonización bacteriana en la leche materna incluyan la piel y la cavidad oral de los recién nacidos expuestos a la microbiota vaginal e intestinal de la madre durante el parto (Mackie RI. y col. 1999; Dominguez-Bello MG. y col. 2010). Por lo tanto, para intentar dilucidar el origen de la microbiota de la leche materna se comparó la composición de las muestras de leche con los datos disponibles para la piel femenina, vagina, cavidad oral, heces, y microbiota de la mucosa intestinal, con un total de 500.000 secuencias de gen ribosómico 16S ARNr. Nuestros resultados sugieren que el microbioma de la leche es de una composición distinta a la de cualquier otro nicho humano, y no puede entenderse como un mero contaminante de la piel (Figura 4), aunque parte de las diferencias podría deberse a que las muestras provienen de madres distintas, y las secuencias obtenidas por diferentes procedimientos. Asimismo, la agrupación de las diferentes muestras de acuerdo con su composición mostró que la microbiota de la leche materna no se asoció con ninguna de las muestras de la mucosa intestinal o muestras fecales. Por lo tanto, el microbioma de la leche materna

no parece ser un subconjunto de otro nicho humano específico. No es por tanto concluyente que la principal vía de transmisión sea la transferencia de bacterias presentes en el intestino humano a la glándula mamaria a través de una ruta endógena (la denominada vía enteromamaria) por medio del sistema linfoide asociado a la mucosa, tal como se ha sugerido (Perez PF. y col. 2007; Donnet-Hughes A. y col. 2010). Artículos recientes han propuesto que un peptidoglicano bacteriano procedente de bacterias del intestino podría trasladarse por la circulación y servir como mediador molecular responsable de un sistema remoto preparatorio de los neutrófilos en la médula ósea. (Philpott DJ. y col. 2010). Otra teoría sugiere la endocitosis de las células bacterianas, que podría estar apoyada por las diferencias observadas entre las cesáreas programadas y no programadas, ya que el estrés y el proceso de parto afecta la permeabilidad intestinal. Trabajos futuros deben determinar si existe un proceso de selección por el cual sólo determinados tipos de bacterias se transfieren o son capaces de sobrevivir para formar la microbiota ácido láctica que es dominante en la leche materna. Esta teoría se ve apoyada por el hecho de que el sistema nervioso afecta en la selección de las bacterias y su traslado a los parches de Peyer (Green BT. y col. 2003). Otra fuente de colonización podría ser la piel y la cavidad oral de los recién nacidos expuestos a la microbiota intestinal y vaginal de la madre durante el parto (Dominguez-Bello MG. y col. 2010), aunque ni el intestino ni la vagina contiene bacterias típicas orales como las detectadas en la leche, y cuyo origen hay que explicar. Nuestros datos muestran un aumento de los habitantes típicos orales en la leche materna en el primer y sexto mes, lo que sugiere que durante la lactancia, las bacterias de la boca del bebé pueden colonizar los conductos de la leche y la areola. Sin embargo, la presencia de bacterias orales ya en el calostro, cuando las posibilidades de contaminación por parte de la boca del lactante son menores, hace pensar que podría ser la leche la que proporcione la colonización inicial de organismos orales en el bebé. Además, se ha descrito que las células dendríticas pueden penetrar en el epitelio intestinal para tomar las bacterias comensales desde el lumen (Rescigno M. y col. 2001), para llegar a la circulación sistémica, y retener incluso bacterias vivas durante varios días (Macpherson AJ. y col. 2004); recientemente, se ha propuesto la transferencia de las bacterias intestinales a las glándulas mamarias dentro de las células dendríticas (Thavagnanam S. y col. 2008; Qutaishat SS. y col. 2003). En definitiva, la ruta de transmisión de bacterias a la leche materna tiene todavía muchos interrogantes y debe ser investigada.

Las exposiciones microbianas prenatales y postnatales tienen profundos efectos sobre la colonización microbiana del intestino y la maduración del sistema inmunitario innato. Dado que las bacterias presentes en la leche materna se encuentran entre las primeras bacterias que entran en el cuerpo humano y dado el papel vital de las bacterias en la fisiología y el desarrollo del sistema

inmunitario del bebé, nuestros datos ponen de relieve la necesidad de entender la función biológica que la microbiota de la leche materna podría jugar en la salud humana. Si la composición bacteriana de la leche materna humana ha coevolucionado para maximizar la eficiencia metabólica del niño y estimular óptimamente su sistema inmunológico, una no adecuada composición de la leche materna podría tener consecuencias importantes para la salud del bebé, teniendo que ser evaluadas para futuras recomendaciones en nutrición infantil.

IV. Estudios de diversidad bacteriana mediante el uso del marcador molecular 16S rRNA

IV.

Capítulo 5. El metagenoma oral de humanos y chimpancés.

5.1. Introducción

En la cavidad oral, el uso de técnicas moleculares ha puesto de manifiesto que aproximadamente la mitad de la diversidad bacteriana está formada por especies que no han sido cultivadas hasta la fecha (Aas JA. y col. 2005), aunque también se ha dado el caso de varias especies cultivadas que no han sido detectados por PCR seguida por una baja cobertura de secuenciación (Donachie SP. y col. 2007). Para evitar el sesgo de cultivo, grandes proyectos de secuenciación, haciendo uso de técnicas de secuenciación de segunda generación, como la pirosecuenciación o plataformas Illumina, han proporcionado estimaciones más completas de la composición bacteriana total que habita en la cavidad oral, variando desde varios cientos a más de 10.000 filotipos bacterianos a nivel de especie (Bik EM. y col. 2010, Kejsler BJ. y col. 2008, Paster BJ. y col. 2001).

Las bacterias que componían la microbiota de nuestros antepasados ha evolucionado presumiblemente para adaptarse a la fisiología humana, la dieta, el sistema inmune y la transmisión de una generación a otra (Ley RE. y col. 2008). Por lo tanto, el estudio de la microbiota de los animales, en especial la de los primates, puede aportar nuevos datos sobre la evolución de las bacterias en el hospedador y su contribución a la salud humana (Moeller AH. y col. 2012). Por ejemplo, es aceptado

que un desequilibrio en la composición de la comunidad de la placa subgingival puede dar lugar a gingivitis y/o enfermedad periodontal, mientras que si este desequilibrio ecológico se produce en la placa dental supragingival podría originar caries (Marsh PD. 1999). Dado que las enfermedades orales parecen ser muy raras en simios salvajes y que parte de los desequilibrios ecológicos que dan lugar a enfermedades orales, tales como la caries dental, parecen ser inducidos por las dietas modernas, post-neolíticas (Gibbons A. 2012), resulta muy interesante estudiar las poblaciones microbianas orales en las especies animales estrechamente relacionadas con los humanos. Sin embargo, existe muy poca información sobre la microbiota oral de los primates. Además, el único estudio realizado hasta la fecha mediante técnicas metagenómicas se ha centrado en el intestino del chimpancé, revelando aspectos importantes acerca de la evolución de la microbiota humana (Moeller AH. y col. 2012).

La composición microbiana oral ha sido estudiada en unos pocos animales que han sido utilizados como modelos para la enfermedad periodontal o la caries dental. Después de los primeros estudios basados en métodos clásicos como el cultivo en roedores (Socransky SS. y Manganiello SD. 1971), monos tití (Brown CH. y col. 1973), y otros animales (Dent VE. y Marsh PD. 1981), otros enfoques mediante técnicas moleculares modernas se han realizado en animales domésticos como perros (Elliott DR. y col. 2005) o gatos (Harvey CE. y col. 1995; Dewhirst FE. Y col. 2012), e incluso mediante herramientas de NGS en perros (Sturgeon A. y col. 2013). A pesar del bajo número de secuencias obtenidas, estos estudios han ofrecido nueva información bacteriana asociada a los animales estudiados. En el presente capítulo, hemos estimado la diversidad bacteriana en la placa dental de tres chimpancés (*Pan troglodytes*) criados en cautiverio mediante una aproximación metagenómica como es la pirosecuenciación directa, aportando nueva información a la ya obtenida anteriormente mediante la realización de librerías de clones del gen ribosomal 16S y pirosecuenciación de amplicones del mismo gen (capítulo 1), ya que se aporta no sólo información taxonómica sino también funcional. Además, esto nos ha permitido comparar las tres metodologías diferentes (clonación y pirosecuenciación de amplicones, ya utilizadas en los capítulos anteriores, y la pirosecuenciación directa de DNA, que evita la clonación y la PCR, y reduce por tanto los sesgos de los anteriores procedimientos). Además, este enfoque metagenómico proporciona los primeros datos sobre el perfil funcional de las comunidades microbianas orales de los chimpancés, que hemos comparado con metagenomas de placa dental supragingival humana obtenida previamente por el mismo procedimiento (Belda-Ferre P. y col. 2012). Desde el punto de vista metodológico los datos están destinados a entender los sesgos que cada enfoque (clonación, PCR, secuenciación directa) puede acarrear y desde el punto de vista biológico pueden proporcionar información acerca de la evolución de la microbiota oral humana mediante la comparación con la especie filogenéticamente más cercana a nosotros. Los objetivos del presente trabajo son proporcionar conocimiento sobre las funciones de los genes codificados en el microbioma

oral de los chimpancés, así como las características comunes entre los seres humanos y estos grandes simios.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Toma de de muestras y extracción de ADN.

Se tomaron muestras de placa supragingival de al menos 8 dientes incluyendo incisivos, caninos, premolares y molares por sus superficies vestibulares de tres chimpancés criados en cautividad, de 25-35 años, provenientes del refugio de animales El Arca de Noé en Alicante, con la ayuda de los cuidadores del refugio, y mediante el raspado con palillos de madera estériles autoclavados (Keijser BJ. y col 2008).

Las muestras se depositaron en tubos eppendorf de 1,5 ml conteniendo 500 µl de tampón fosfato. Se extrajo el ADN con el kit de extracción MasterPure complete DNA and RNA Purification (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo un paso adicional con tratamiento de lisozima (5 mg/ml a 37 °C durante 30 minutos) para una mejor lisis de todo el abanico de bacterias que contiene la microbiota oral. La concentración del ADN se midió en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Fisher Scientific), obteniendo valores de absorbancia a 260/280 nm de 1,6 a 1,9 y una cantidad final de 0.5-1.5 ug de ADN por muestra. Una vez realizadas con éxito las PCRs del gen 16S, el ADN sobrante se combinó para proceder a su pirosecuenciación directa.

5.2.2. Pirosecuenciación directa del DNA de la placa dental

Las muestras de 6 voluntarios humanos seleccionados se procesaron de forma individual para su pirosecuenciación en MacroGen Inc. (Seul, Corea del Sur), incluyendo las muestras de 2 individuos sanos que nunca habían padecido caries, 2 con caries en el pasado pero con buena salud bucodental, y 2 con mala salud bucodental en el momento de tomar la muestra y más de 10 caries activas. El metagenoma de estos donantes está incluido en Belda-Ferre y col. 2012. El ADN de de placa dental supragingival de los tres chimpancés se mezcló para proceder posteriormente a su pirosecuenciación en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública (Valencia, España). Todas las muestras se pirosecuenciaron usando el equipo GS-FLX con química Titanium (Roche, Basilea, Suiza), utilizando

mediante cuartos de placa.

5.2.3. Asignación taxonómica de las lecturas y estimación de la diversidad.

Las lecturas que pertenecían al gen ribosomal 16S rRNA fueron extraídas del metagenoma por búsqueda de similitud con MG-RAST (Meyer F. y col. 2008), con un punto de corte e-value de $1e^{-10}$. Se eliminaron secuencias <200 pb. La asignación filogenética de las secuencias se realizó mediante el Clasificador RDP (Wang Q. y col. 2007), utilizando un umbral de confianza del 80%. Las nuevas unidades taxonómicas operacionales (OTUs) se asignaron mediante este clasificador a nivel de phylum, clase, familia y género.

La estimación del número de especies observadas y esperadas en el nicho bucal se realizó mediante curvas de rarefacción, usando el programa Ararefaction (Holland SM. 2003). Las curvas de rarefacción estiman tanto el número de géneros esperados, como el de especies [E(S)] en una muestra tomada al azar. Mediante los datos tomados de un censo o colección de datos y a partir del número de individuos de cada género, se calcula cuántos géneros se esperan en una muestra de n individuos (James FC. y Rathbun S. 1981). La construcción de curvas de rarefacción puede ser vista como un proceso de extrapolación, que hipotéticamente nos daría la riqueza verdadera del ecosistema (Colwell RK. y col. 2004). Para estimar la diversidad total en las muestras por pirosecuenciación directa, cada secuencia asignada taxonómicamente a nivel de género se considero como la abundancia de un cluster, existiendo tantos cluster como géneros se asignaron.

5.2.4. Análisis funcional de las lecturas y análisis estadístico.

Todo el conjunto de datos fue procesado utilizando el servidor MG-RAST (Meyer F. y col. 2008) eliminando replicados artefactuales y secuencias pertenecientes al genoma humano o del chimpancé, siguiendo Belda-Ferre P. y col. 2012, y prediciendo las secuencias codificantes. Para obtener una perspectiva de las semejanzas y diferencias de la microbiota de los chimpancés y la microbiota oral de los seres humanos se procedió a la comparación de la clasificación jerárquica de las proteínas del sistema de clasificación SEED (segundo nivel) de ambos grupos (Aziz RK. y col. 2008). Para la comparación con las muestras de placa dental humana se utilizaron metagenomas descritos anteriormente (Belda-Ferre P. y col. 2012). La anotación de las lecturas filtradas se realizó con los siguientes parámetros: mayor del 30% de identidad a nivel de aminoácidos en la alineación, y un E-value menor de $1e^{-5}$. El análisis exploratorio inicial de las muestras se realizó utilizando el programa MG-RAST que incorpora tanto el análisis PCoA como mapas de calor (heatmap). La agrupación de las

muestras (clustering) se llevó a cabo de acuerdo a su perfil funcional, para explorar las diferencias entre las muestras normalizadas al segundo nivel de la clasificación jerárquica de las funciones proteicas. Además, el análisis detallado se llevó a cabo en R (versión 2.12.1), utilizando los datos en bruto y normalizando según el tamaño de todas las lecturas por muestra descargadas y anotadas anteriormente por el MG-RAST, para la posterior realización de un heatmap con la biblioteca gplots de R (Warnes GR. 2010), con valores normalizados y agrupados mediante el método de Pearson. Finalmente, se realizó un análisis en base a la tasa de falso descubrimiento (False Discovery Rate, FDR) (White JR. y col. 2009), para estimar la cantidad de predicciones de falsos positivos y determinar si las diferencias entre grupos eran estadísticamente significativas ($p < 0,05$; 1000 permutaciones) para funciones sobre-representadas. Para el análisis FDR se definieron 2 conjuntos: chimpancé frente a muestras humanas, y chimpancés y humanos sanos contra muestras humanas con caries.

5.2.5. Asignación del metagenoma del chimpancé a especies bacterianas.

Todas las lecturas obtenidas en el metagenoma del chimpancé después de ser filtradas y procesadas por el servidor MG-RAST, como se describe en el punto anterior, fueron comparadas frente a todos los genomas bacterianos orales de la Human Oral Microbial Database (HOMD <http://www.homd.org/index.php>). Para ello se utilizó el programa MUMmer versión 3.23 (Delcher AL. y col. 2002), para alinear cada uno de los 1229 genomas de la HOMD con los parámetros por defecto (Kurtz S. y col. 2004). Para visualizar los datos, los resultados se representaron gráficamente utilizando el programa Mummerplot, mostrando la cobertura del metagenoma del chimpancé respecto a los genomas de referencia en una dimensión (reclutamientos metagenómicos). Estos reclutamientos nos dan a conocer qué cepas bacterianas hallamos en el metagenoma del chimpancé. Se ha demostrado que la identidad promedia de nucleótidos (ANI) entre los genes ortólogos de diferentes cepas de la misma especie está, en promedio, por encima del 94% (Konstantinidis KT. y Tiedje JM. 2005). De hecho, un umbral del 95% se ha propuesto como sustituto de los ensayos de hibridación ADN-ADN clásicos para las asignaciones taxonómicas de nuevas especies (Richter M. y Rossello-Mora R. 2009). Los valores de ANI entre 90-95% corresponden a especies del mismo género (Konstantinidis KT. y Tiedje JM. 2005; Mira A. y col. 2002; Haley BJ. Y col. 2010). En el caso de especies pertenecientes a géneros distintos de la misma familia, como *Escherichia* y *Salmonella*, el ANI de genes ortólogos se encuentra alrededor del 80 % (Goris J. y col. 2007). De esta forma, los reclutamientos con valores por encima del 94% fueron considerados como evidencia de la presencia en la muestra de la especie cuyo genoma estaba siendo reclutado (Belda-Ferre y col. 2011).

5.3. Resultados y Discusión.

5.3.1. El metagenoma oral del chimpancé.

El conjunto de datos del chimpancé en bruto comprende 415.247 lecturas con una media de longitud de 300 ± 115 pb. Después de pasar las lecturas por el control de calidad se mantuvo un total de 382.257 lecturas, siendo éstas utilizadas para predecir secuencias codificantes de proteínas y rRNAs. Un total de 344.695 lecturas pudieron ser agrupadas, a una identidad del 90% , correspondiendo a 30.751 familias de genes. La anotación de las secuencias se realizó por homología frente a varias bases de datos (IMG, SEED y KEGG), siendo posible predecir una posible codificación para 295,974 lecturas (85,86%). Para el rRNA se obtuvo un total de 57,052 secuencias que fueron identificadas y agrupadas al 97% de identidad.

5.3.2. Comparación de tres métodos utilizados para determinar la biodiversidad oral.

Para determinar si se obtienen diferentes resultados taxonómicos mediante diferentes aproximaciones, tres métodos distintos fueron aplicados a las muestras CA101, CH-002, y NC-2002: pirosecuenciación directa de ADN y asignación de los genes 16S rRNA extraídos del metagenoma ("meta"), pirosecuenciación directa de los productos de PCR ("16S-pyro") y clonación de gen 16S rDNA amplificado y posterior secuenciación tipo Sanger ("16S-clon"). Los resultados se muestran en la Figura 1, e indican diferentes proporciones en algunas de las familias, como en Actinomycetaceae, Fusobacteriaceae o Flavobacteriaceae, mientras que otros taxones muestran proporciones similares. Aunque algunas de estas inconsistencias se deben a diferencias en el esfuerzo de muestreo (un orden de magnitud mayor en la pirosecuenciación de amplicones), gran parte de las diferencias están probablemente causadas por los sesgos de cada metodología. Como se observa a nivel de familia, cada método tiene una afinidad mayor o menor por determinados grupos taxonómicos. En la muestra CH-002, la pirosecuenciación directa y de amplicones proporcionó resultados muy similares, si bien los tres métodos dieron lugar a resultados dispares en la muestra CA101 (Figura 1). El sesgo de la PCR es común en los dos últimos métodos: los cebadores "universales" no amplifican igualmente todos los taxones debido a las diferencias en la secuencia complementaria a los cebadores (Sipos R. y col. 2007). En el caso de la clonación del gen ribosomal 16S existe también el sesgo asociado a la propia clonación, debido a los efectos tóxicos de ciertos genes en el huésped (en este caso, *E. coli*) que puede impedir o dificultar la clonación de los genes de ciertas especies (Sorek R. y col. 2007). Por lo tanto, el método de pirosecuenciación de productos de PCR puede ser más fiable, además de presentar mayor cobertura.

Sin embargo, esta metodología produce resultados diferentes a los obtenidos por pirosecuenciación directa sin PCR, que es presumiblemente la aproximación con menor sesgo (González JM. y col. 2012).

En cuanto a los aspectos metodológicos podemos concluir que, comparada con la clonación de amplicones, la pirosecuenciación de productos de PCR permite una secuenciación más barata y rápida, con un mayor número de secuencias en un tiempo muy corto para estimar la diversidad biológica, si bien no escapa de los sesgos impuestos por la PCR. Otro aspecto que hay que tener en cuenta es que la detección de microorganismos se realiza en los tres métodos en base al ADN, que puede incluir especies que no son parte de la microbiota oral activa. Estas especies pueden ser ingeridas con los alimentos y estar de forma transitoria o incluso inerte, sobrestimando la verdadera diversidad. Una posible solución a esta sobre-estimación de la diversidad podría pasar por basar nuestros estudios en muestras de ARN, para detectar las bacterias que forman parte activa de la biopelícula oral, y no a especies transitorias, inertes o contaminantes que no contribuyen al ecosistema. Por último la pirosecuenciación directa es presumiblemente la aproximación con un menor sesgo, pero su coste impide analizar un número elevado de muestras.

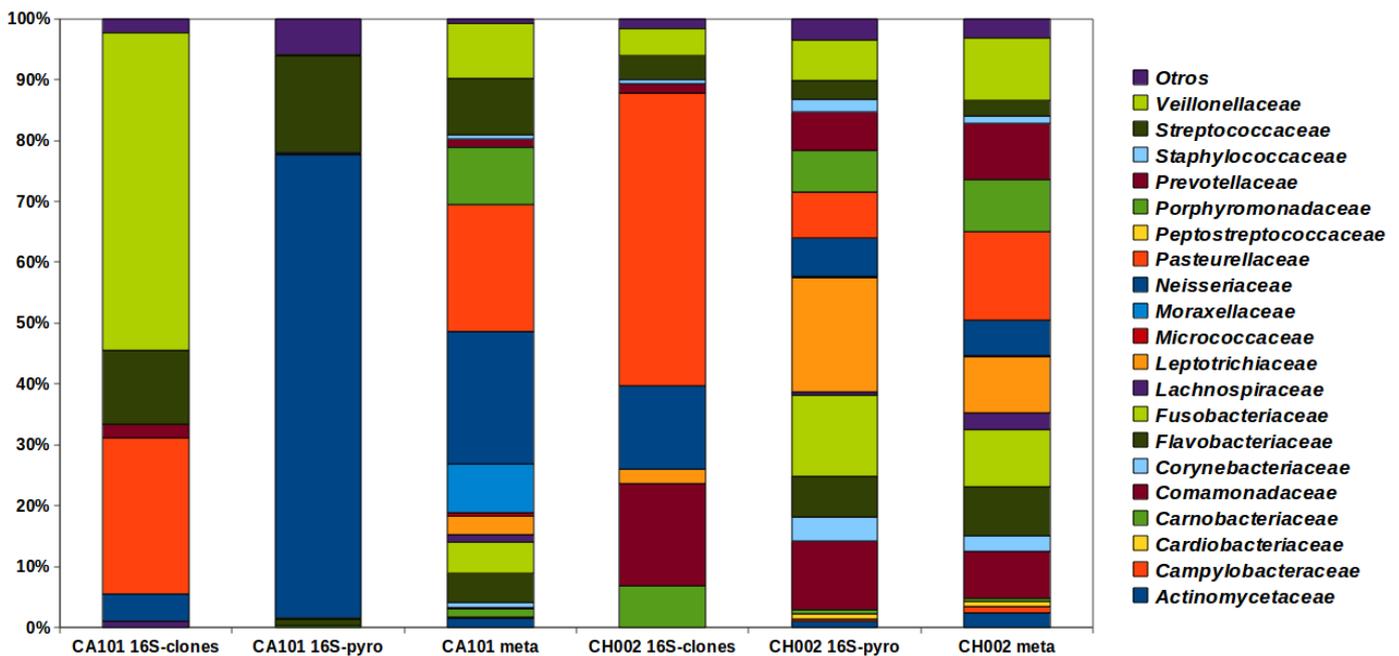


Figura 1. Composición de la microbiota oral de un donante humano (CA101) y un chimpancé (CH002) a nivel taxonómico de familia estimada mediante las tres metodologías empleadas para analizar la biodiversidad. Los tres métodos aplicados a las diferentes muestras fueron: pirosecuenciación directa de ADN (meta), pirosecuenciación directa de los productos de PCR (16S-pyro) y clonación del gen 16S rDNA amplificado y posterior secuenciación Sanger (16S-clones).

5.3.3. Cálculo de la diversidad esperada mediante curvas de rarefacción.

Se comparó el número de OTUs (unidades taxonómicas operacionales) en relación con el número de secuencias analizadas del gen 16S obtenidas por pirosecuenciación directa en muestras de placa dental humana y chimpancés (tomando en ambos casos el valor de $n=3$). Se realizaron por separado curvas de rarefacción para las muestras de humanos y chimpancés a partir de los géneros asignados mediante la RDP (figura 2). Lo primero que observamos es que estamos lejos de saturación ya que el número de secuencias asignadas del gen ribosomal 16S de los metagenomas es baja. Además observamos que en base a estos datos de pirosecuenciación directa, los chimpancés tienen una mayor diversidad a nivel de género en comparación con los humanos. La diversidad estimada fue mayor a la hallada en el capítulo 1 mediante amplicones del 16S, lo cual pueda ser debido al sesgo que introduce la PCR, al no amplificar toda la diversidad contenida en un determinado nicho, observando realmente por pirosecuenciación directa del ADN sin amplificar la verdadera biodiversidad de la cavidad oral en humanos y chimpancés.

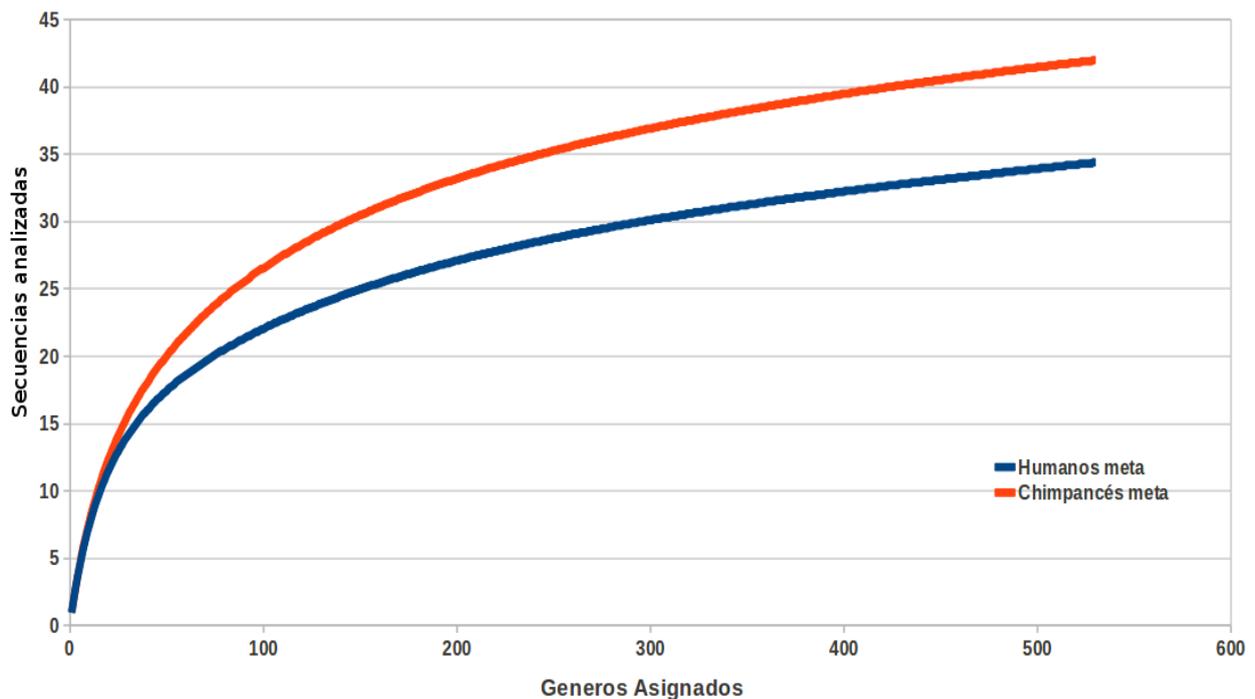


Figura 2. Número de Géneros predichos en relación al número de secuencias del gen 16S analizadas mediante pirosecuenciación de amplicones, y mediante pirosecuenciación directa en muestras de placa dental humana ($n=3$) y chimpancé ($n=3$).

5.3.4. Funciones sobre-representadas en la microbiota del chimpancé.

Las lecturas del metagenoma oral del chimpancé se asignaron a un total de 303 funciones en base al segundo nivel de jerarquía de la base de datos SEED. La abundancia relativa de estas categorías

de genes se muestra en la Figura 3. Dos vías de agrupación de los genes funcionales muestran que el metagenoma del chimpancé está relacionado funcionalmente con las muestras de humanos sanos o sin caries. Las filas muestran el agrupamiento de funciones que están representados según el estado de salud. En la parte superior del heatmap se pueden observar los grupos funcionales sobre-representados sólo en chimpancés. En la parte media del heatmap se muestran las funciones de los genes sobre-representados en los voluntarios con caries dental. Curiosamente hay otro grupo de funciones sobre-representadas en los humanos adultos sanos, que son similares al perfil de abundancia del chimpancé. En la parte inferior del heatmap se encuentran los genes que están sobre-representados tanto en chimpancés como en humanos sanos. Las muestras CA1_001P y CA1_002P pertenecen a muestras humanas de individuos sanos, con antecedentes de caries empastadas previamente, mientras que NOCA_001P y NOCA_003P son adultos que nunca habían desarrollado caries. Las funciones indicadas en el heatmap son aquellas con diferencias significativas entre grupos, de acuerdo con el test FDR ($p < 0,05$). La lista completa de las funciones de genes con diferencias significativas se puede consultar como material suplementario (Anexo 5.1).

Entre las funciones sobre-representadas del chimpancé, cuando se compara con las muestras humanas, podemos encontrar varios candidatos para hacer frente a las respuestas ambientales como las proteasas de membrana Ybbk (QmcA), probablemente implicadas en el control de calidad de la proteína de membrana (Chiba S. y col. 2006; Hinderhofer y col. 2009). Los genes de la biosíntesis de carotenoides y ácido lipoico están sobre-representados, posiblemente, para hacer frente a un ambiente REDOX y la realización de funciones antioxidantes entre bacterias de la boca (Packer L. y Cadenas E. 2011; Polyakov NE. y col. 2006). Los genes de respuesta de estrés ácido están sobre-representados en los chimpancés y el papel es el de controlar la respuesta al ambiente ácido. Este es un rasgo esperado por varios tipos de descarboxilasas, histidina quinasa, transportadores de glutamina, y glutaminasas, y la regulación del ciclo de nitrógeno para la producción de amonio, así como la producción de alfa-cetoglutarato, que puede dar lugar al anión bicarbonato (HCO_3^-) que contribuye a regular la acidez (Welbourne T. y col. 1998). Una característica importante del ambiente oral es la presencia de micronichos en los que las condiciones de las variables físico-químicas (es decir, pH, oxígeno disponible, temperatura, etc) pueden limitar o promover el crecimiento de microorganismos específicos (Simon-Soro A. y col. 2013). En el caso del chimpancé observamos una sobre-representación de genes implicados en la aerotolerancia descritas en grupos de bacterias que no son precisamente abundantes bajo altas concentraciones de oxígeno, como *Bacteroides fragilis* y especies afines (Tang YP. y col. 1999).

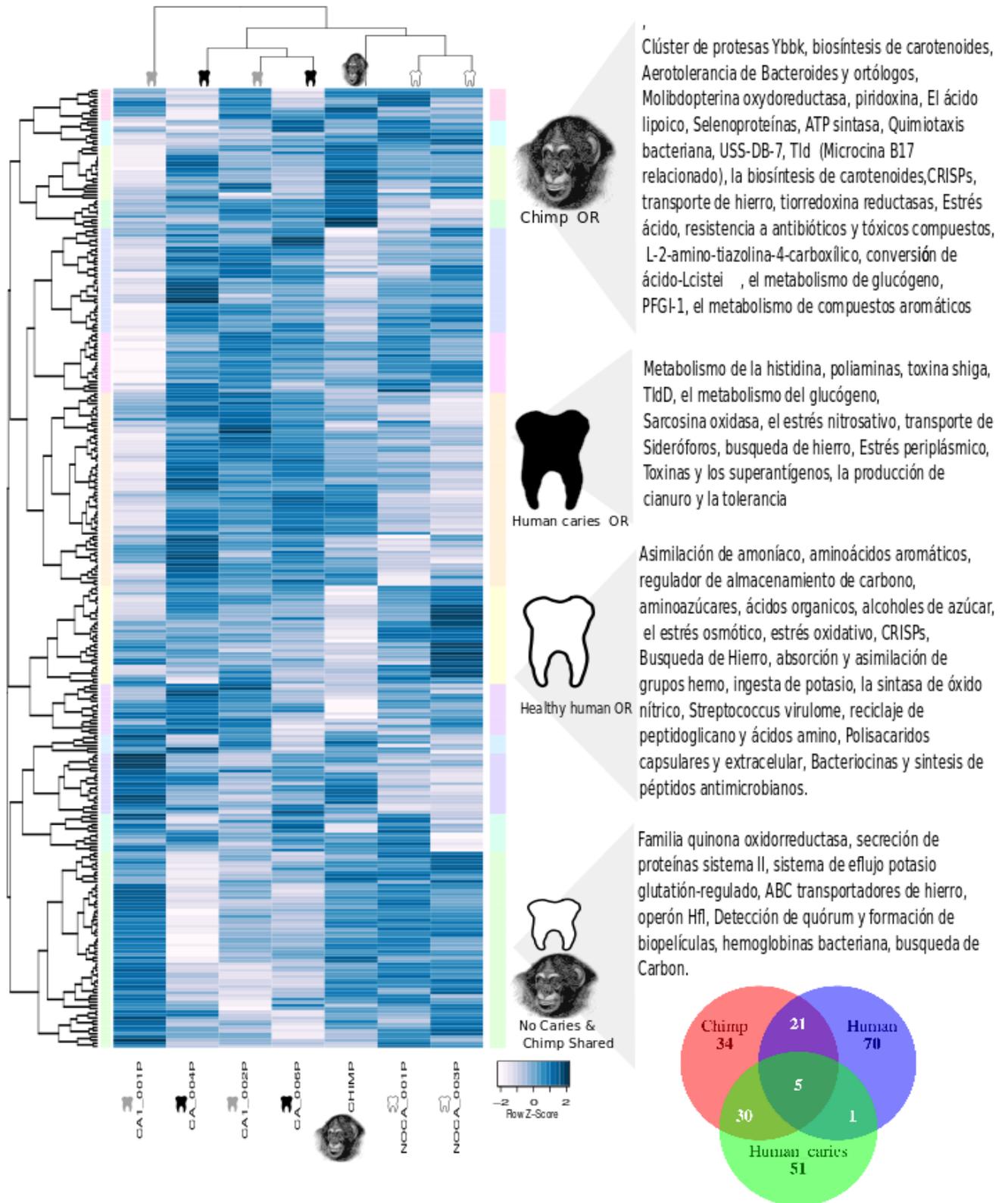


Figura 3. Perfil funcional del metagenoma oral del chimpancé en comparación con la placa dental humana de adultos sanos y con caries. La clasificación se basa en el Subsistema Jerarquía 2 de clasificación SEED. Los recuentos se normalizaron al número total de lecturas por muestra, agrupándose por dos vías (descrito en materiales y métodos). El azul claro a oscuro indica los niveles de infra- y sobre-representación de funciones, respectivamente. Los bloques de categorías de genes que están sobre-representados ($p < 0,05$) se indican en cada una de las dos microbiotas. Se han identificado las funciones de genes exclusivos en los seres humanos sanos, en los seres humanos con caries, en el chimpancé y un grupo basal de funciones compartidas entre los seres humanos sanos y los chimpancés. Las secuencias del metagenoma bucal de adultos fueron tomados de Belda-Ferre y col. 2012. El diagrama de Venn en la esquina inferior derecha indica el número de funciones únicas y compartidas entre muestras de simios y humanos con y sin caries. OR: Over-represented (funciones sobre-representadas).

Las interacciones bacterianas están presentes entre las funciones sobre-representadas del chimpancé, como los genes de quimiotaxis, así como genes implicados en relaciones antagónicas como es el caso del cluster Tld conteniendo genes relacionados con la síntesis de microcinas, que inhiben la función de la ADN girasa de los competidores, así como una actividad proteolítica intrínseca (Allali N. y col. 2002). Las interacciones bacterianas también están mediadas por genes relacionados con la tolerancia y la resistencia a los antibióticos, y compuestos tóxicos (ej, síntesis de péptidos no ribosomales (NRPS), beta-lactamasas, bombas de flujo arsénico resistentes, genes relacionados con la resistencia a metales, etc. Estos genes sobre-representados en chimpancés pueden ser debidos a la transferencia horizontal de genes (HGT), que distribuye genes con valor adaptativo entre taxones no relacionados (Ej, resistencia a los antibióticos). Este grupo incluye el grupo PFGI-1 que codifica la conjugación integradora, y varios elementos móviles (Mavrodi DV. y col. 2009).

5.3.5. Funciones sobre-representadas en humanos con caries.

El nitrógeno y el hierro parecen tener un papel importante en humanos con caries ya que estas funciones están sobrerrepresentadas (Figura 3). Las funciones de estrés nitrosativo, también sobre-representadas, pueden ser la respuesta bacteriana al ataque del huésped por medio de óxido nítrico, como mecanismo de defensa (Poole RK y Hughes MN. 2000). Otra respuesta interesante relacionada con el control de las especies reactivas al nitrógeno, dentro de la célula, viene dada por el grupo de hidrólisis de cianato observado en muestras de humanos con caries, utilizado tal vez de forma bifuncional, primero para obtener una fuente de nitrógeno, y segundo, para modular los niveles de ácido en el entorno por transformación del bicarbonato en ácido carbónico, y reduciendo así el pH, ayudando o previniendo una posterior proliferación de bacterias acidogénicas (Merlin C. y col. 2003). El metabolismo de la histidina está también sobre-representado en humanos con caries. El metabolismo de la histidina permite la conversión de histidina en histamina, y esto podría tener una relación con la respuesta inflamatoria para prevenir la infección (Allaker RP. y col. 2009). El transporte y la compactación del hierro son cruciales para los patógenos humanos. También es la primera línea de defensa para restringir la disponibilidad de hierro cuando existe un proceso de infección, conociéndose como "inmunidad nutricional", por lo que se espera que la comunidad bacteriana tenga sobre-representados los genes de supervivencia con limitación de hierro, pudiendo ello estar relacionado con la regulación de la virulencia, el estrés ácido, y las respuestas de estrés oxidativo (Carpenter BM. y col. 2009). Aunque la deficiencia de hierro es general para las bacterias halladas en la placa dental supragingival, están sobre-representadas varias vías de respuesta al hierro como el transporte, la adquisición y el metabolismo de éste en los chimpancés y en los pacientes libres de caries. También es cierto que los humanos con caries activas tienen sobre-representada la captación al hierro, lo cual

podría ser debido al transporte de hierro mediante sideróforos (Carpenter BM. y col. 2009), siendo indispensable para ciertas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* en la formación de biopelículas (Banin E. y col. 2005). Por último, se encuentra sobre-representada la categoría de estrés periplásmico, pudiéndose entender como una respuesta bacteriana a la agresión del huésped (Chaba R. y col. 2011).

5.3.6. Funciones sobre-representadas en humanos que nunca han tenido caries.

Los adultos que nunca habían desarrollado caries tienen sobre-representadas diferentes funciones para captar diversas fuentes de carbono (Figura 3), que presumiblemente utilizan para producir polisacáridos capsulares y extracelulares, así como para producir ácidos orgánicos, alcoholes y osmoprotectores. También están sobre-representados en humanos sanos (sin caries) los genes relacionados con la ingesta de potasio hiperosmótico, por lo que parece que la presión osmótica, la concentración de iones, y la absorción pueden desempeñar un papel importante para el conjunto de la microbiota asociada a seres humanos sanos, pudiendo ser crucial para la colonización del entorno (Stingl y col. 2007). Características relacionadas con el metabolismo del nitrógeno y el hierro están también presentes en los seres humanos sanos, pero probablemente con algunas diferencias, como por ejemplo las funciones sobre-representadas de la óxido nítrico sintetasa, que podría ser sinérgica junto con el hospedador para producir óxido nítrico a fin de inhibir el crecimiento de otras bacterias (Poole RK. y Hughes MN. 2000). La producción de ácido orgánico podría ser un desencadenante, con la reducción del pH del medio ambiente y como consecuencia evitar la desmineralización de los dientes y el consiguiente desarrollo de caries (Badet MC. y col. 2001; Hasslöf P. y col. 2010). Por contra la producción bacteriana de ácidos orgánicos podría ayudar a inhibir el crecimiento de ciertas bacterias de manera dependiente de concentración (Midolo PD. y col. 1995). Otra función que está sobre-representada en voluntarios sanos es la producción de bacteriocinas y péptidos antibacterianos, tal como ha sido descrito anteriormente (Belda-Ferre y col. 2012), lo cual es congruente con la identificación de este tipo de sustancias en las librerías metagenómicas de placa dental (Capítulo 6). Algunos genes hallados en *Streptococcus* están relacionados con la biosíntesis de exopolisacáridos, epimerasas, y endopeptidasas que también están sobre-representados en humanos sanos.

5.3.7. Funciones sobre-representadas compartidas entre chimpancés y humanos sanos.

Las funciones compartidas entre los humanos sanos y los chimpancés y sobre-representadas cuando se comparan con las muestras de humanos con caries se encuentran en la parte inferior de la figura del heatmap (Figura 3). Los chimpancés en condiciones naturales no parecen desarrollar caries (Cohen DW. y Goldman HM. 1960; Kilgore L. 1989) y en comparación con los seres humanos adultos que no

desarrollaron caries es muy interesante conocer las funciones compartidas. Aunque el desarrollo de los dientes, hábitos de conducta, dietas y diferentes presiones ambientales son muy diferentes en cada una de las dos especies, es posible que este grupo de genes pertenezca a una defensa basal o condiciones favorables para prevenir la caries. Existen funciones sobre-representadas y compartidas comunes al punto anterior, como el estrés oxidativo, osmoprotección, transporte y adquisición de hierro, y los mecanismos de privación de carbono (Figura 3). El estrés oxidativo es una función sobre-representada en gran parte por la quinona oxidoreductasa, cuyo papel es el de reducir moléculas relacionadas con la quinona, moléculas del grupo azo, y compuestos nitro (Ross MA. 2000), así como las funciones sobre-representadas del glutatión redox con defensa antioxidante (Harlan JM. y col. 1984). Para la limitación del hierro las funciones sobre-representadas compartidas entre el chimpancé y los seres humanos sanos muestran transportadores ABC de hierro, así como hemoglobinas bacterianas (Braun V. y Hantke K. 2011). Otras estrategias como los mecanismos de inanición están también sobre-representadas en este grupo, probablemente usado en el ciclo de aminoácidos para construir proteínas nuevas (Damerau K. & St John AC. 1993). La detección de moléculas de “quorum sensing”, y la formación de biofilm son también funciones sobre-representadas en este grupo, junto con el operon Hfl, que alberga la chaperona Hfq responsable en varias especies para el control fino, a través de pequeños RNAs (Lenz DH. y col. 2004; Sonnleitner E. y col. 2006; Toledo-Arana y col. 2007), de la formación de biopelículas, patogenicidad, y quórum sensing, así como la regulación de metabolismo del hierro de almacenamiento, y las proteínas que usan hierro (Massé E. y Arguin M. 2005; Massé E. y Gottesman S. 2002; Romby P. y col. 2006). En este grupo de funciones compartidas entre los chimpancés y los seres humanos sanos, las funciones sobre-representadas sugieren que la coordinación y el establecimiento de las comunidades bacterianas, la protección contra el estrés oxidativo, mecanismos nutricionales eficaces, así como maneras de obtener el escaso hierro y estrategias de regulación fina son elementos clave para la supervivencia y el mantenimiento de una comunidad microbiana oral sana.

5.3.8. Presencia de funciones sobre-representadas en genomas de bacterias orales.

Uno de los puntos débiles del análisis de secuencias ribosomales es la asignación taxonómica a nivel de especie, debido a la corta longitud de las lecturas. En el capítulo 2, se mostraban los resultados de composición bacteriana en humanos y chimpancés a nivel taxonómico de familia. Como se podía observar los chimpancés tenían una mayor diversidad en la microbiota oral, a pesar de ser especímenes en cautividad, conteniendo un alto número de géneros que no se encontraban en muestras humanas. Nosotros hemos realizado reclutamientos comparando el metagenoma oral del chimpancé frente a los genomas orales para observar la identidad promedia obtenida de cada secuencia del metagenoma del chimpancé. Cuando la identidad promedia estaba por el 94 % o superior, el reclutamiento

metagenómico se considera que corresponde a cepas de la misma especie y por lo tanto se hallan en la cavidad oral de los chimpancés (figura 4; aunque en la figura se muestran los promers [por la escasa visualización de los núcleos] de las especies que cumplían estos parámetros) (Belda Ferre y col. 2011). Las especies más importantes encontradas mediante comparaciones del metagenoma del chimpancé frente a genomas secuenciados, fueron, por orden de abundancia: *Gemella morbillorum* M424, *Propionibacterium propionicum* F0230a, *Streptococcus sanguinis* SK36, *Neisseria subflava* NJ9703 y *Porphyromonas gingivalis* W83. Estas cinco especies no serán las únicas que habiten en el nicho oral del chimpancé, pero para detectar otras bacterias que se encuentran en baja proporción necesitaríamos realizar un esfuerzo de secuenciación mayor, además de que otras especies no contarán con genomas de referencia secuenciados.

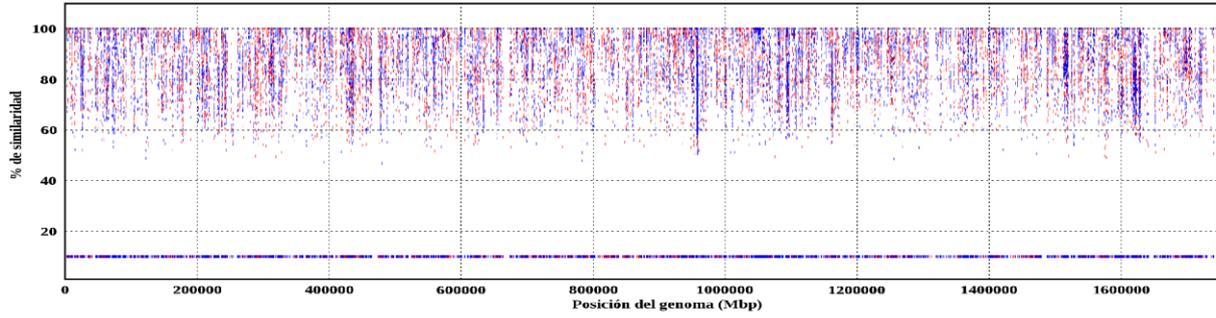
El análisis funcional que se ha realizado con el metagenoma del chimpancé nos ha permitido conocer las funciones sobre-representadas de éste cuando son comparadas con muestras humanas. Entre ellas, se encuentran los genes de biosíntesis de carotenoides y ácido lipoico que están involucrados en la realización de funciones antioxidantes entre bacterias de la boca (Packer L. y Cadenas E. 2011; Polyakov NE. y col. 2006). Estos mismos genes se encuentran en las especies *Gemella morbillorum* M424 y *Propionibacterium propionicum* F0230a. Otra función sobre-representada es la respuesta al medio ambiente ácido, como puede ser la regulación del ciclo de nitrógeno y la producción de amonio, así como la producción de alfa cetoglutarato que puede oxidar más al bicarbonato y por lo tanto regular la acidez (Welbourne T. y col. 1998) como se ha encontrado en *Neisseria subflava* NJ9703 y *Fusobacterium nucleatum*. Como se describió anteriormente, dependiendo de las variables físico-químicas, como pH, oxígeno, o temperatura encontrados en los micro-nichos de la cavidad oral, se halló una sobre-representación de genes implicados en aerotolerancia, correspondiente a organismos estrictamente fermentativos, encontrándose en especies halladas en el microbiota oral como *Porphyromonas gingivalis*.

Otros de los genes sobre-representados en el chimpancé fueron los que median interacciones bacterianas, como la resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos, encontrando genes de resistencia bacteriana como beta-lactamasas en *Gemella morbillorum* M424, *Propionibacterium propionicum* F0230a y *Streptococcus sanguinis* SK36. Además se encontraron genes de resistencia al arsénico mediante bombas de flujo en *Neisseria subflava* NJ9703, *Fusobacterium nucleatum* y *Leptotrichia buccalis* C1013b. Por último, un papel clave, entre otros, en el mantenimiento de una comunidad microbiana oral sana son las maneras de obtener el escaso hierro. Quizás haya una competencia entre ellos para captar hierro y así iniciar la degradación de radicales superóxido o SOD dependiente del hierro como ocurre en *Gemella morbillorum* M424, *Propionibacterium propionicum* F0230a y *Neisseria subflava* NJ9703. Por lo que podemos afirmar que

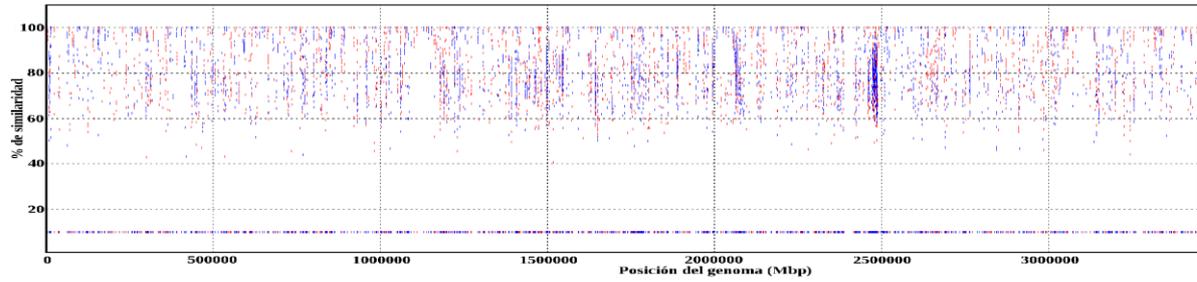
los genomas de las especies más comunes mediante los reclutamientos contienen gran parte de las funciones sobre-representadas en el metagenoma del chimpancé.

En resumen, la agrupación del perfil funcional de los chimpancés con los voluntarios sanos, sugiere que las funciones compartidas entre ambos pueden ser indicativas de un microbioma asociado a condiciones de salud, independientemente de que las bacterias involucradas sean distintas a nivel taxonómico (Zaura E. y col. 2009), recalcando la importancia de aproximaciones funcionales sobre las taxonómicas, y la probable presencia de distintas comunidades microbianas con el mismo resultado funcional favorable para condiciones de salud.

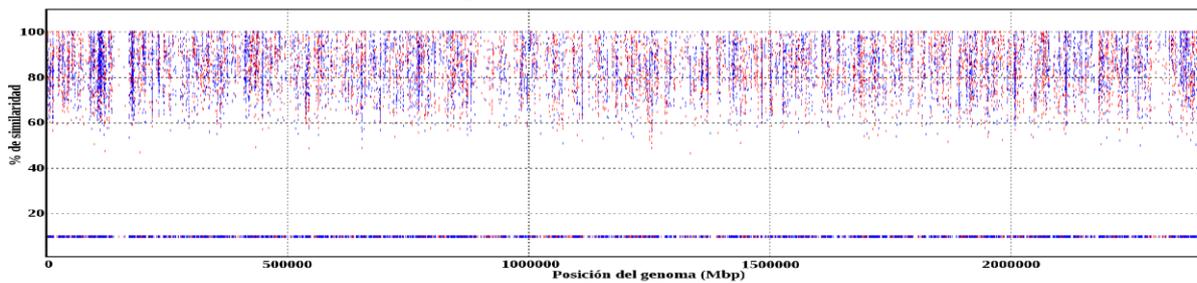
Gemella morbillorum M424



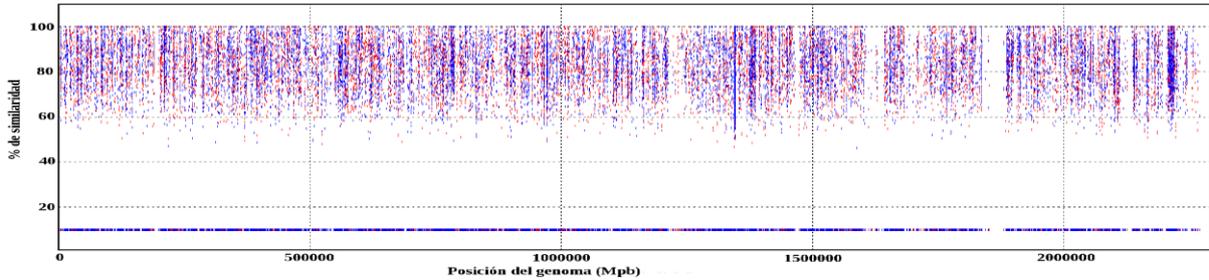
Propionibacterium propionicum F0230a



Streptococcus sanguinis SK36



Neisseria subflava NJ9703



Porphyromonas gingivalis W83

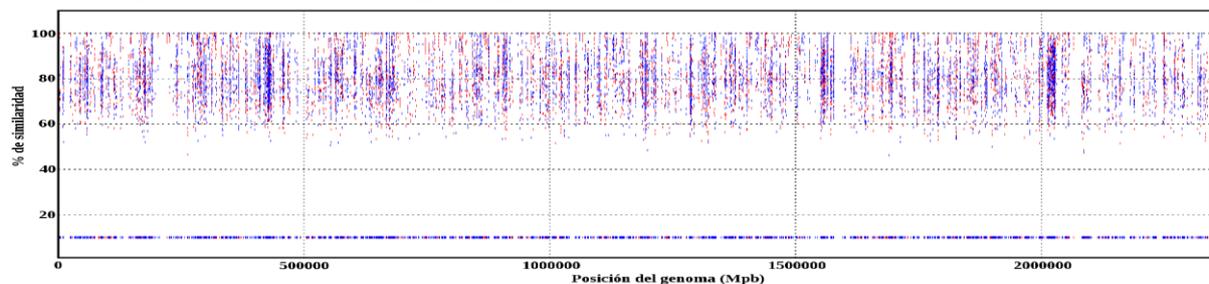


Figura 4. Reclutamientos del microbioma dental del chimpancé contra genomas bacterianos orales de la HOMD (<http://www.homd.org/index.php>). Se muestran comparaciones del metagenoma de la placa dental del chimpancé frente a las especies bacterianas secuenciadas más abundantes en dichos reclutamientos, en concreto *Gemella morbillorum* M424, *Propionibacterium propionicum* F0230a, *Streptococcus sanguinis* SK36, *Neisseria subflava* NJ9703 y *Porphyromonas gingivalis* W83.

V. Aplicaciones biotecnológicas mediante librerías metagenómicas y por cultivo

V.

Capítulo 6.

Elaboración de librerías metagenómicas de placa dental y desarrollo de un cribado de actividad antimicrobiana frente a mutans streptococci.

6.1. Introducción.

La cavidad oral tiene una enorme diversidad bacteriana (Simmonds RS. y col. 2000, Aas JA. y col. 2005), ya que está compuesta por diversos micronichos que varían en su composición procariota (Simon-Soro A. y col. 2013). Se calcula que el número total de especies supera las 500 (Paster BJ. y col. 2001) y, aunque muchas de ellas son comensales, otras pueden ser causantes de enfermedades muy comunes, como la caries y las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis). En un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2004 se estima que cinco mil millones de personas en el planeta sufren caries dental (Petersen PE. 2004). Según el mismo informe, existe la idea de que la caries dental ha dejado de ser un problema en los países desarrollados, cuando en realidad afecta a entre un 60% y un 90% de la población escolar y a la gran mayoría de los adultos. Los efectos de las enfermedades bucodentales en términos de dolor, sufrimiento, deterioro funcional y disminución de la calidad de vida son considerables y costosos. Se estima que el tratamiento representa entre el 5% y el

10% del gasto sanitario de los países industrializados, y está por encima de los recursos de muchos países en desarrollo.

Según la OMS, un porcentaje alto de niños presentan signos de gingivitis (sangrado de las encías), y entre los adultos son comunes las periodontopatías en sus fases iniciales. Entre el 5% y el 15% de la mayoría de los grupos de población sufre periodontitis grave, que puede ocasionar la pérdida de dientes (Petersen PE. 2004). En palabras de la Dra. Catherine Le Galès-Camus, Subdirectora General de la OMS para Enfermedades No Transmisibles, “en todo el mundo se considera que la pérdida de dientes es consecuencia natural del envejecimiento, pero, en realidad, puede prevenirse”.

La higiene oral y la pérdida de dientes pueden potencialmente afectar la microbiota gastrointestinal y el estado nutricional, y por lo tanto puede tener implicaciones en el desarrollo de enfermedades crónicas. Por ejemplo, una mala higiene bucal, la pérdida de dientes, o ambos, han sido relacionados con enfermedades del tracto digestivo, incluyendo cáncer oral, gástrico y de esófago (Abnet CC. y col. 2001). Varios estudios sugieren que la placa dental es un reservorio de *Helicobacter pylori* (Song Q. y col. 2000), bacteria que cuando se encuentra en el tracto digestivo constituye un conocido factor de riesgo para el desarrollo de úlcera y cáncer gástrico (Kasper S. y col. 2014). Recientemente se ha propuesto que la pérdida de dientes puede estar asociada con el cáncer de páncreas, al igual que la seropositividad de *H. pylori* (Stolzenberg-Solomon y col. 2001). Así pues, un mejor conocimiento del ecosistema bucal y las interrelaciones entre los microorganismos que lo habitan es fundamental no sólo para disminuir el impacto de las enfermedades de la boca sino también para prevenir otras enfermedades que se ven influenciadas por la microbiota oral.

Una muy buena alternativa al cultivo para el estudio de las patologías orales se basa en los abordajes genómicos y metagenómicos. Mediante la secuenciación y anotación de genomas se puede obtener información muy valiosa acerca de los genes involucrados en las patologías orales (King JN. y col. 2013). En un estudio previo en el que se aplicaron metodologías de secuenciación masiva, nuestro grupo encontró diferencias significativas entre individuos con caries e individuos que nunca habían sufrido caries, sugiriendo que la placa dental de individuos sanos podría ser un reservorio biológico para la identificación de nuevos compuestos anticaries y probióticos (Belda-Ferre P. y col. 2012). En individuos sin caries los microorganismos mayoritarios resultaron ser miembros de los grupos *Bacilli* y *Gamma-Proteobacteria*, mientras que en individuos con caries grupos taxonómicos típicamente anaeróbicos, como *Clostridiales* y *Bacteroidetes*, fueron los más abundantes. Otros autores han observado la abundancia de géneros como *Aggregatibacter*, *Rothia* y *Streptococcus* del grupo Mitis en individuos sanos mientras que en individuos con caries predominaban especies como *Streptococcus gordonii*, *Leptotrichia*

buccalis y, sobre todo, *Veillonella parvula* (Aas JA. y col. 2005). Además, relacionando la taxonomía con la función se pudo predecir qué papel metabólico o ecológico desempeña cada grupo de bacterias. Por ejemplo, se observó que una gran proporción de genes involucrados en mecanismos de defensa eran codificados por *Bacillales*, encontrándose una sobrerrepresentación de genes que codifican para péptidos antimicrobianos en individuos que nunca habían sufrido caries (Belda-Ferre P. y col. 2012).

La complejidad de la comunidad bacteriana de la placa dental dificulta la identificación de los agentes bacterianos responsables de la caries, aunque hay evidencias de que *Streptococcus sobrinus* y sobre todo *Streptococcus mutans* están directamente implicados en la cariogénesis (Loesche WJ. 1986). Por ello, las estrategias de lucha frente a la caries se han focalizado en estas dos especies, aunque más concretamente en *S. mutans* y su antígeno de superficie SA I/II, siendo las glucosiltransferasas que produce factores cruciales para la colonización (Kleinberg I. 2002). Además, la existencia de una pequeña proporción de población humana que nunca ha tenido caries sugiere que hay algunas especies bacterianas con efecto antagonista sobre las bacterias cariogénicas (Corby PM. y col. 2005). En un trabajo reciente de nuestro grupo se muestra cómo el reclutamiento metagenómico de bacterias cariogénicas contra la microbiota oral de individuos sanos revela una total ausencia de *S. mutans*, y por el contrario, la presencia en una alta proporción de otros *Streptococcus* relacionados con *S. sanguis*, *S. mitis* y *S. oralis* (Belda-Ferre y col. 2012). Dado que estas especies podrían estar directamente involucradas en la inhibición de las bacterias cariogénicas, se intentó el aislamiento de material genómico bacteriano con potencial inhibidor mediante librerías metagenómicas de fósmidos para poder tener acceso a los genes de bacterias no cultivables, abriendo así una vía para la identificación de los compuestos secretados responsables de la inhibición de bacterias productoras de caries.

La técnica de las librerías metagenómicas consiste en la extracción directa del ADN total de la comunidad microbiana, su fragmentación y su inserción en *E. coli*, obviando así la necesidad de cultivo. En este capítulo se puso a punto esta técnica para realizar cuatro metagenotecas de la placa dental supragingival, dos de individuos libres de caries y otras dos de individuos con caries. El cribado o screening de estas metagenotecas ha permitido el hallazgo de sustancias inhibidoras de los *Streptococcus* del grupo *mutans*, algunas de las cuales han sido patentadas, estando una de ellas en fase de escalado industrial.

El interés del presente capítulo es doble, ya que por una parte se clonó el material genético presente en la placa dental humana obteniéndose cuatro metagenotecas que permiten explorar la diversidad genética presente en individuos con caries y su comparación con individuos que nunca han sufrido caries. Por otra parte se han estudiado una serie de compuestos codificados en los fósmidos que

inhiben el crecimiento de bacterias cariogénicas, como *Streptococcus mutans*, y *Streptococcus sobrinus*. Mediante la identificación de los genes involucrados en la respuesta inhibitoria y la caracterización de los péptidos codificados se ha abierto una interesante y prometedora vía para el desarrollo de alternativas terapéuticas para la prevención y/o el tratamiento de la caries.

6.2. Materiales y Métodos.

6.2.1. Obtención de muestras de la placa dental supragingival.

Se obtuvo placa dental supragingival de cuatro voluntarios después de firmar el consentimiento informado. El procedimiento de muestreo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Dirección General de Salud Pública de la Generalitat Valenciana. El estado de salud bucal de cada voluntario fue evaluado por un dentista siguiendo las recomendaciones y nomenclatura de las encuestas de salud bucodental de la OMS. Se seleccionaron dos voluntarios que nunca habían padecido caries (índice CAO igual a 0), y otros dos con caries en el pasado (índices CAO 0,68 y 0,21 para los voluntarios CA0_001P y CA1_003P respectivamente). El índice CAO es el promedio de dientes permanentes careados, ausentes y obturados. Se trata de una expresión cuantitativa del historial de caries de los dientes permanentes. Otros criterios de inclusión fueron tener una edad superior a 20 años y la presencia de todas las piezas dentales en el momento de la toma de muestras, sin contabilizar los terceros molares (muelas del juicio). A los voluntarios seleccionados se les tomó una muestra de placa dental supragingival sobre las superficies vestibular y lingual de todos los dientes con una microcucharilla odontológica estéril. Se pidió a los voluntarios no cepillarse los dientes durante las 24 horas previas a la toma de muestras. Se obtuvo información sobre la higiene oral, dieta y signos de enfermedad periodontal (Tabla 1).

Voluntario	Género	Edad	Presencia de caries	CAO	Cepillado	Enfermedad periodontal
NoCA_010P	Mujer	42	No	0	1 / día	Encía sana
NoCA_01P	Hombre	25	No	0	2 / día	Inflamación leve
CA1_001P	Hombre	38	Si	0,68	1 / día	Inflamación leve
CA1_003P	Hombre	30	Si	0,21	1 / día	Inflamación leve

Tabla 1. Datos clínicos de los voluntarios.

6.2.2. Extracción de DNA de la placa dental supragingival.

El ADN se extrajo mediante el kit MasterPure Complete DNA and RNA Purification (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo un paso previo de tratamiento con lisozima (1 mg/ml, 37 °C, 30 min). Se obtuvo ADN libre de ARN siguiendo el protocolo del fabricante. Se tuvo especial cuidado en no agitar bruscamente la muestra en ninguna de las etapas, además de utilizar puntas de pipeta cortadas durante todo el proceso, para prevenir la rotura mecánica del ADN y obtener fragmentos grandes para su clonado en fósmidos. La concentración de ADN se obtuvo mediante Nanodrop 2000 (Fisher Scientific). Las muestras con una concentración de ADN por encima de los 300ng/μl y un valor de ratio de la absorbancia 260/280 nm de entre 1.7 a 1.9 fueron seleccionadas para cada voluntario.

6.2.3. Elaboración de librerías metagenómicas de la placa dental supragingival.

Se realizaron cuatro librerías metagenómicas de fósmidos (insertos de hasta 35-45 kb) siguiendo el proceso mostrado en la Figura 1. Para ello se utilizó el Epicentre CopyControl Fosmid Library Production Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante, usando como vector el plásmido pCC1FOS que se muestra en la Figura 2.

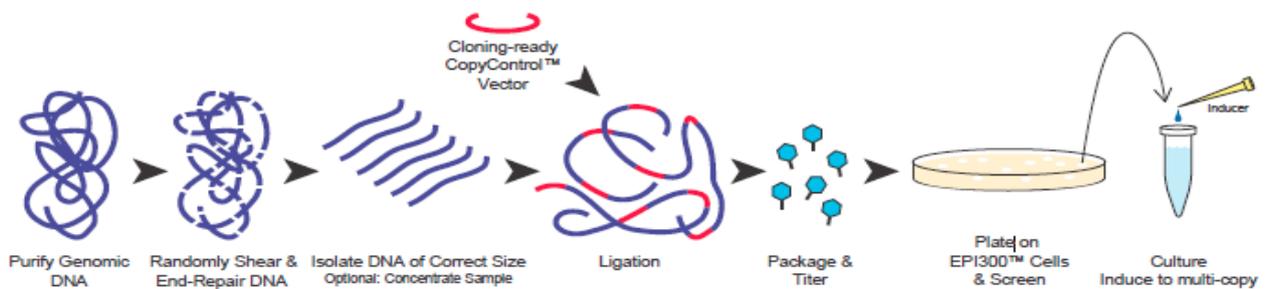


Figura 1. Esquema de la construcción de una librería de fósmidos.

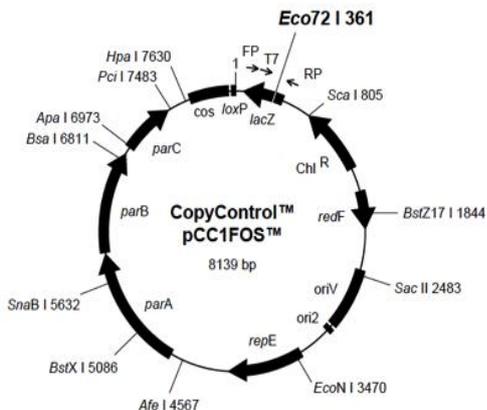


Figura 2. Vector pCC1FOS. El punto de inserción del ADN viene dado por el punto de corte de Eco72. Se indican los principales genes del vector, incluido el gen de resistencia al cloranfenicol (Chl).

Para determinar el tamaño del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 0.6%, usando como marcadores de tamaño dos DNAs control, uno de 12 Kb (Thermo Fisher) y otro de 45 Kb (Fosmid control DNA, proporcionado por el kit de Epicentre). Tras una electroforesis a 4 °C aplicando un voltaje de 20 mV durante 16 horas se comprobó que los fragmentos obtenidos se encontraban mayoritariamente en el rango de tamaño recomendado para la clonación en fósmidos, entre 20 y 45 Kb.

La reparación de extremos del ADN extraído, su ligación al vector, el empaquetado en fagos y la transfección de las células de *E. coli* EPI300T1^R, se realizaron con el kit de Epicentre CopyControl Fosmid Library Production Kit.



Figura 3. Obtención de colonias de *E. coli* una vez realizada la transducción.

Pasado el tiempo de incubación necesario para el crecimiento de los clones, se picaron las colonias usando palillos estériles. Cada colonia se inoculó en un pocillo de una placa multipocillo (Nunc, VWR) conteniendo 150 µl de medio LB con cloranfenicol, y se incubó con agitación a 37°C durante toda la noche. Una vez obtenido crecimiento bacteriano se añadieron 70 µl de glicerol al 50% en cada pocillo (concentración final 19%), para evitar la formación de cristales de hielo durante su congelación. Las placas multipocillo se sellaron con una membrana impermeable (Adhesive PCR foil seals Thermocat) y se almacenaron a -70°C. Los fósmidos se congelaron sin inducir a copia múltiple para evitar procesos de recombinación entre el ADN genómico y el del plásmido.

6.2.4. Ensayos de inhibición frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

La inducción a copia múltiple de los plásmidos consiste en la inducción de hasta 50 copias por célula, aumentando enormemente la producción de ARNm y potencialmente de producto proteico a testar en los cribados. La inducción a copia múltiple se realizó con todos los clones obtenidos añadiendo la solución de inducción contenida en el kit de Epicentre y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se realizaron cultivos de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en aerobiosis utilizando medio infusión cerebro corazón (BHI, Pronadisa). Primeramente se inocularon en medio líquido colonias aisladas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se inocularon 250 µl del cultivo crecido en placas con medio BHI para obtener un crecimiento en tapiz.

Una vez inducidos los plásmidos, se sembraron los clones de *E. coli* en las placas crecidas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Se utilizaron placas rectangulares y un “pin replicator” para realizar este ensayo con un alto rendimiento y en un tiempo limitado. La placa inoculada con los clones de *E. coli* se dejó crecer a 37 °C. Tras 24 horas de incubación se visualizaron las placas en busca de halos de inhibición.

Para la realización de estos ensayos los clones de *E. coli* se crecieron en infusión cerebro corazón en ausencia de cloranfenicol, pues las cepas de *S. mutans* y *S. sobrinus* son sensibles al antibiótico.

6.2.5. Extracción del ADN plasmídico de los clones positivos frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

Una vez determinados cuáles eran los clones que producían inhibición frente a las especies testadas se realizó la inducción a copia múltiple, y se extrajo el ADN plasmídico mediante el kit Plasmid MimiPrep₉₆ (Millipore). El tamaño del inserto se comprobó mediante una electroforesis a bajo voltaje, como se especifica en el apartado 6.2.3., incluyendo como marcadores de peso molecular ADNs de tamaño conocido (45 kb y 10 kb). Por último se midió la concentración con el Nanodrop 2000 (Fisher Scientific), así como los ratios de absorbancia a 260/280 nm.

6.2.6. Secuenciación de los extremos de los insertos de los clones inhibitorios.

La secuenciación de los plásmidos extraídos se realizó mediante el método de Sanger utilizando cebadores que hibridan con los extremos del vector pCC1FOS (ver Figura 2), el T7 (5'-GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3') y el M13R (5'-CTCGTATGTTGTGTGGAATTTGTGAGC-3'). Las secuencias obtenidas se procesaron con el programa Gap4 que forma parte del paquete Staden (Staden R. y col. 2000). Las secuencias de los extremos de los insertos se asignaron taxonómicamente mediante el programa BLAST (Altschul SF. y

col. 1990).

6.2.7. Secuenciación completa de los insertos de los clones inhibitorios

Los fósmidos de tamaño superior a 2 kb se procesaron para su pirosecuenciación, mediante el pirosecuenciador GS-FLX con química Titanium (Roche, Basilea, Suiza), en CSISP (Valencia, España), agrupando el ADN de hasta 5 fósmidos por octavo de placa (100,000 secuencias aprox.). Las secuencias obtenidas se ensamblaron mediante el programa Newbler (Roche) usando los parámetros estándar. Las secuencias completas se asignaron con los fósmidos correspondientes en base a las secuencias de los extremos previamente obtenidas por secuenciación Sanger. Las secuencias se procesaron para asignarlas taxonómicamente mediante el programa BLAST (Altschul SF. y col. 1990).

6.2.8. Búsqueda de la fracción activa frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

Se indujeron a copia múltiple los fósmidos con actividad inhibitoria frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* en un volumen de 50 ml. Cada uno de los cultivos inducidos a multicopia se centrifugó a 12.000 rpm para recoger el sobrenadante, que se filtró por filtros de 0.2 micras de tamaño de poro (Millipore) para eliminar restos de bacterias. Posteriormente el sobrenadante se filtró secuencialmente a través de filtros Amicon (Millipore) de 100 KDa, 10 KDa y 3 KDa (Figura 4), obteniendo así cuatro fracciones de tamaño: mayor 100 KDa, entre 100-10 KDa, entre 10-3 KDa, y menor de 3 KDa.

Las tres primeras fracciones quedan ya concentradas al volumen mínimo mediante los filtros utilizados. La fracción menor de 3 KDa se concentró con el rotavapor hasta un volumen final de 3 ml (partiendo de 50 ml de cultivo). La actividad de cada una de las fracciones se testó frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* en placas de 48 pocillos. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para determinar el crecimiento o la ausencia de crecimiento de las dos especies se midió la densidad óptica cada media hora en un luminómetro Fluostar, durante 12-19 horas.

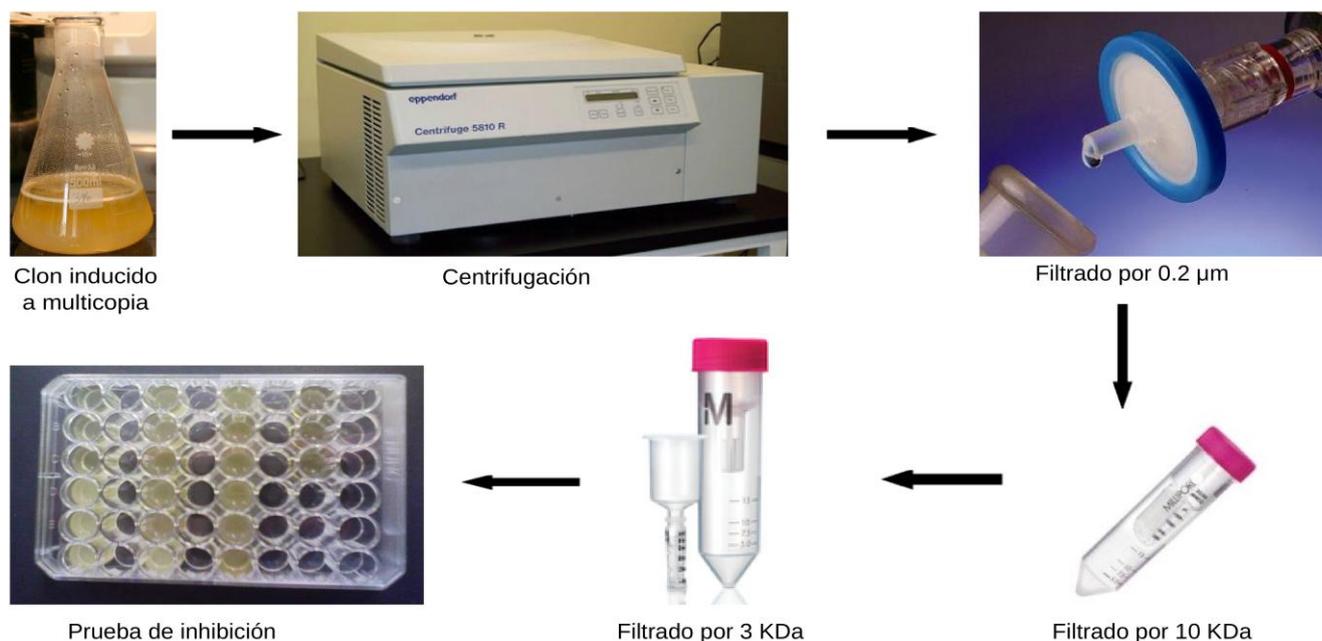


Figura 4. Proceso de filtración de cada fósido para comprobar la secreción de la sustancia inhibitoria de las bacterias cariogénicas, y en caso afirmativo comprobar el rango de tamaños de los inhibidores.

6.2.9. Identificación de los péptidos antimicrobianos en los fósidos positivos

6.2.9.1. Fósidos con insertos de pequeño tamaño (500-1500 pb).

Se analizaron las secuencias completas de los insertos de corta longitud obtenidas al ensamblar los dos extremos secuenciados por tecnología Sanger. Se leyeron todos los posibles marcos abiertos de lectura (ORFs) codificados tanto en sentido 3'-5', como en sentido 5'-3', identificando además la secuencia de Shine-Dalgarno (TCACCTCCTTA) que normalmente se encuentra unos 6-9 nucleótidos antes del codón de inicio de la traducción, regulándola. De entre estos ORFs se seleccionaron todos aquellos que contuvieran esta secuencia de unión al ribosoma, así como aquellos que pudieran ser excretados, bien por la presencia de un péptido señal (identificado por el software SIGNAL-IP) o por una vía no clásica de secreción (identificado por el software SECRETOME-P).

6.2.9.2. Fósidos con insertos de gran tamaño (28-34 Kb.).

Tras la secuenciación completa de los fósidos con insertos de gran tamaño se realizó un análisis bioinformático consistente en dos etapas:

1. Anotación de todos los posibles genes por homología mediante el programa RAST (Aziz RK. y col. 2008).

2. Predicción de ORFs mayores de 15 aa, y búsqueda de posibles péptidos antimicrobianos de origen bacteriano descritos en la literatura. Para ello se utilizaron las bases de datos de bacteriocinas “BACTIBASE” (Hammami R. y col. 2007) y “BAGEL” (Jong A. y col. 2006), analizando las tres posibilidades por cada sentido (un total de 6 posibles marcos de lectura). Los hits obtenidos se compararon mediante BLAST frente a la base de datos nr del NCBI y con la base de datos CAMP, elaborada por el Doctor Miguel Pignatelli, que contiene todas las bacteriocinas patentadas hasta la fecha de los ensayos. Se calcularon además otras características físico químicas asociadas a péptidos antimicrobianos, como son la carga neta, contenido en G+C, hidrofobicidad y peso molecular, utilizando la herramienta en línea desarrollada por el Doctor Pignatelli (http://metagenomics.uv.es/cgi-bin/gbrowse/Fosmids_AMPs/).

6.2.10. Ensayos de inhibición en medio líquido e inhibición comparada frente a productos comerciales.

Una vez determinada la fracción inhibitoria del sobrenadante de los fósmidos positivos (apartado 6.2.8.) se realizaron de nuevo ensayos de inhibición frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*. Se añadieron diferentes volúmenes (50, 100, 150 y 200 μ l) de la fracción activa. Para el crecimiento de *S. mutans* y *S. sobrinus* se utilizó caldo infusión cerebro corazón partiendo de una densidad óptica inicial de 0.05. El crecimiento se monitorizó mediante medidas de densidad óptica (absorbancia a 600 nm) cada media hora durante 12-19 horas, en un lector de placas Fluostar (BMG Labtech) o en un lector TECAN (Tecan Group Ltd) Cada ensayo se hizo por triplicado.

A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos se realizó una valoración comparada del efecto inhibitor de cada fósmino frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*. Además se comparó el efecto inhibitor de cada fósmino frente a uno de los enjuagues bucales con acción antiséptica líderes en el mercado, Listerine®. Para comparar el efecto inhibitor del fósmino S12E con Listerine se realizaron los mismos experimentos de crecimiento de *S. mutans* y *S. sobrinus* en medio líquido BHI, con los siguientes tratamientos: a) añadiendo 100 μ l de Listerine®, y b) añadiendo 100 μ l del sobrenadante concentrado del clon S12E que contiene la bacteriocina predicha (fracción 3-10 kDa).

Por último, se comprobó el espectro de acción de los fósmidos, testando la fracción activa frente a otras especies bacterianas aerobias de distintos grupos taxonómicos: *Bacillus CECT40*, *Staphylococcus epidermidis* (Gram positivos, *Firmicutes*), *Micrococcus luteus* (*Actinobacteria*), *Sphingomonas paucimobilis* (*Alpha Proteobacteria*), *Burkholderia cepacea* (*Beta Proteobacteria*), *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*

CECT 101, *Klebsiella pneumoniae*, ssp *pneumoniae* CECT 143 (*Gamma Proteobacteria*) y *Chryseobacterium aquaticum* (*Bacteroidetes*).

6.2.11. Actividad de los péptidos sintetizados.

Se sintetizó químicamente uno de los péptidos producido por el clon S12 identificado como responsable de la actividad inhibitoria contra las bacterias cariogénicas. La síntesis del péptido se realizó según el método de síntesis de fase sólida (Ermolat'ev DS. y col. 2005). Se obtuvieron aproximadamente 15 mg del péptido S12E que se resuspendieron en 200 µl de ácido trifluoroacético (TCA) al 0.1% obteniendo una solución stock de 15 mg/ml. Se realizaron diluciones seriadas del stock para obtener concentraciones finales de 2 mg/ml y 0,2 mg/ml. Para calcular la concentración mínima inhibitoria frente a las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* se realizaron tests de inhibición con el péptido a las tres concentraciones, siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior y utilizando una solución 0.1% de TCA como blanco para las medidas de absorbancia.

6.3. Resultados.

6.3.1. Elaboración de librerías metagenómicas en muestras de placa dental.

Se obtuvieron cuatro librerías metagenómicas de placa dental supragingival, dos de voluntarios sin caries y dos de voluntarios con caries en el pasado. Se obtuvieron unos 5000 clones por muestra (Tabla 2) que se almacenaron a -80°C, para posteriores estudios exploratorios de diversidad genética y estudios funcionales de búsqueda de actividad inhibitoria frente a bacterias cariogénicas.

6.3.2. Búsqueda de actividad inhibitoria de *S. mutans* y *S. sobrinus*.

De los 20.000 clones testados, buscamos aquéllos que produjeran un halo inhibitorio sobre el tapiz de *Streptococcus mutans* (o *Streptococcus sobrinus*). Estos clones se seleccionaron para el estudio de posibles compuestos antibacterianos de interés (Figura 5). De las cuatro librerías testadas encontramos 49 fósmidos con actividad inhibitoria frente a *Streptococcus mutans*, de los que solamente 17 presentaron también actividad inhibitoria frente a *Streptococcus sobrinus* (Tabla 2).

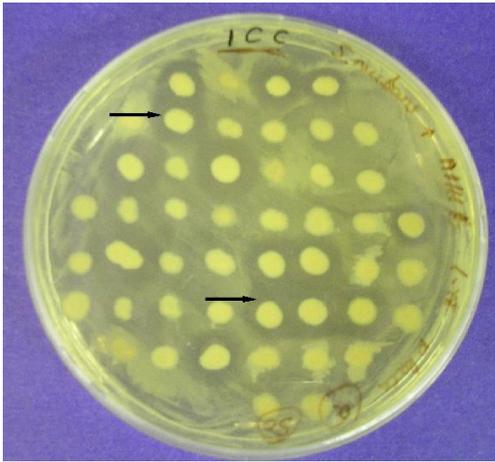


Figura 5. Cribado inicial, de los clones de *E.coli* que contienen fósmidos procedentes de ADN de placa dental de individuos sin caries. Se observan halos de inhibición en un cultivo en tapiz de *Streptococcus mutans*. Las flechas muestran halos de inhibición alrededor de los clones de *E. coli*.

Librería	Número de placas	Número de clones	Número de clones con posible actividad	Número de clones con actividad frente a <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>
NoCA_010P	54	5184	23	17
NoCA_01P	55	5280	19	0
CA1_001P	52	4992	7	0
CA1_003P	65	6240	0	0

Tabla 2. Resultados obtenidos tras la realización de las cuatro librerías metagenómicas y su posterior cribado frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

Para corroborar la actividad de los clones positivos frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*, se realizó de nuevo el test de inhibición únicamente con los fósmidos que fueron positivos en el primer cribado. De los 49 clones que inicialmente produjeron inhibición, únicamente 17 resultaron positivos en el segundo cribado (Figura 6). Tras la extracción del DNA de los clones correspondientes y la secuenciación de sus extremos se comprobó mediante BLAST que ocho fósmidos eran idénticos o casi idénticos en la secuencia, debido probablemente a la contaminación cruzada entre los pocillos de una placa o (más improbable) a la clonación reiterada del mismo fragmento, restando finalmente nueve fósmidos diferentes. Se comprobó que cuatro de ellos tenían origen bacteriano y cinco, origen humano (éstos últimos, motivo de análisis en otra tesis doctoral) (Tabla 4).

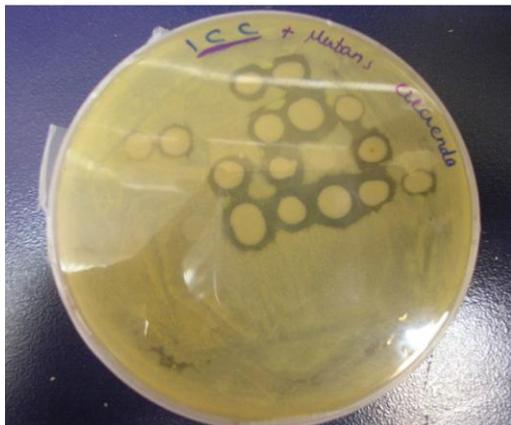


Figura 6. Screening de confirmación. La figura muestra los clones que producen halos de inhibición frente a un cultivo en tapiz de *Streptococcus mutans*.

6.3.3. Secuenciación completa de los fósmidos positivos frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

Se obtuvo la secuencia completa de los nueve clones que presentaron actividad inhibitoria frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* tras el segundo cribado (los cinco fósmidos que contenían insertos de origen humano no se analizaron durante esta tesis). Dos de los fósmidos presentaron insertos con un tamaño comprendido entre las 500-1500 pb (fósmidos S12E Y T5A), mientras que el resto oscilaba entre 28023 y 42797 (Tabla 4), procediéndose a estudiar los fósmidos de origen bacteriano T4H, T9B y T1F.

6.3.3.1. Fósmidos de pequeño tamaño.

Las secuencias completas de los dos fósmidos con inserto comprendido entre 500 y 1500 pb se obtuvieron mediante el ensamblaje de las secuencias de los extremos. El inserto de origen humano completamente secuenciado por este procedimiento presentó 232 nucleótidos, y es objeto de estudio en otra tesis doctoral, mientras que el bacteriano presentó 666 nucleótidos.

6.3.3.2. Fósmidos de gran tamaño.

Las secuencias completas obtenidas por pirosecuenciación de los tres insertos bacterianos de tamaño largo, (fósmidos T4H, T9B y T1F) presentaron 28023, 33899 y 42797 nucleótidos respectivamente. Como se muestra en la Tabla 4 se clonó material genético que dio porcentajes de identidad elevados con distintas especies bacterianas secuenciadas.

6.3.4. Identificación de los péptidos antimicrobianos.

6.3.4.1. Identificación de los péptidos antimicrobianos en fósmidos con insertos cortos.

Tras el análisis de los ORFs contenidos en el inserto, se identificó un candidato de origen bacteriano de 39 aminoácidos que mostró una composición de aminoácidos característica de los péptidos antimicrobianos. Esto, unido a su corta longitud y su carga neta positiva a pH ácidos, sugirió que se trataba de una bacteriocina (Berjeaud JM. y col. 2004). La secuencia de los 39 aminoácidos del fósrido de origen bacteriano es la siguiente:

Met P F E A V G E A R L A A R T S R P G D R G P G N R A E E S P D S A E Q G G G Stop

Esta secuencia de aminoácidos tiene el tamaño predicho en los experimentos previos (entre 3-10 KDa) ya que su peso molecular es de 3984,25 daltons. Se calculó su carga neta a pH neutro en -2, con un punto isoeléctrico de 4.77. A pH 4.5, la carga neta aumenta a 1.1, y a pH 4 su carga neta es de 3.1.

6.3.4.2. Identificación de péptidos antimicrobianos en fósmidos con insertos largos.

La anotación de los tres fósridos con insertos largos de origen bacteriano (T1F, T4H y T9B) permitió la identificación de posibles genes responsables de la inhibición frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* (Tabla anexa 6.1). Para el fósrido T4H no se obtuvo ningún indicio de cuál o cuáles podrían ser los genes involucrados en la respuesta inhibitoria observada experimentalmente. Aunque no se encontraron genes previamente identificados como involucrados en la acción inhibitoria, la anotación reveló que los insertos están dotados de múltiples genes de respuesta al estrés, y aportó indicios de qué gen o grupo de genes pueden codificar sustancias con efecto inhibidor.

En el fósrido T1F se encontraron genes implicados en la asimilación del hierro en *Porphyromonas gingivalis* (“Outer membrane hemin receptor” y “Large exoproteins involved in heme utilization or adhesion”, Dashper SG. y col. 2000). Estos genes podrían estar directamente involucrados en la inhibición, como sugieren otros autores (Poole RK. y Hughes MN, 2000). Otro gen de interés presente en este fósrido es el que codifica para “Oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase”. Esta enzima produce la reducción de metronidazol, otorgando al microorganismo resistencia a este compuesto, y produciendo hidroxilamida, potente mutágeno y bactericida (Whiteway J. y col. 1998). Se

trata por tanto de un claro candidato como gen responsable de la acción inhibitoria, cuyo producto proteico podría ser excretado al medio mediante un sistema transmembrana codificado también en el inserto (“Lipoprotein releasing system LolC”) . Por último encontramos dos genes de interés que codifican para “Putative enzyme” y “Ribosome-binding factor A”; se ha demostrado que la primera inhibe específicamente las interacciones anticuerpo-antígeno, estudiada en saliva por Poethke y colaboradores en el año 1996, y la segunda parece estar implicada en el inicio de la traducción bajo condiciones de estrés (Jones PG. y col 1996).

En el fósido T9B detectamos una putativa “Signal Peptide Protein”, que podría ser la responsable de la inhibición frente a *S. mutans*. Tras estudiar todos los posibles ORFs, no se encontró un claro candidato del tamaño predicho, aunque es muy probable que el posible inhibidor sufra modificaciones post-traduccionales, como es típico de las bacteriocinas (Guder A. y col. 2000; Stepper J. y col. 2010). De hecho, se encontró por duplicado el gen que codifica para la enzima “Tail-specific protease precursor” (EC 3.4.21.102), que participa en la escisión de un péptido C-terminal de la forma precursora de la proteína de unión a penicilina 3 (PBP3) y que también podría estar involucrada en la protección de la bacteria frente a tensiones térmicas y osmóticas (Kuroda M. y col. 2001). También encontramos un gen que codifica una permeasa (“major facilitator superfamily”), un transportador de membrana que podría facilitar la secreción del péptido inhibidor al medio extracelular (Pao SS. y col. 1998). Por último, este inserto contiene dos genes que codifican para “Mechanosensitive ion channel family protein”, involucrada en la homeostasis osmótica (Pivetti CD. y col. 2003), y “Competence protein”, que confiere la capacidad a las células para captar ADN exógeno de su entorno, y que probablemente es un importante mecanismo para la transferencia horizontal de genes (Kramer N. y col. 2007). Por último, este inserto contiene una “Ribosome-associated heat shock protein” implicada en el reciclaje de la subunidad 50S, que constituye una respuesta al estrés (Korber P. y col. 2000), quizás relacionada con los bajos valores de pH tras la fermentación de azúcares en la boca por la ingesta de comida.

Los posibles péptidos codificados en los fósidos detectados mediante la herramienta de predicción de péptidos antimicrobianos (como se detalla en el apartado 6.2.9.2.; accesible en http://metagenomics.uv.es/cgi-bin/gbrowse/Fosmids_AMPs/) se detallan en la Tabla 3.

T1F							
Position	SignalP	NB Classifier	Hidrophobic	Net Charge	Blast CAMP	Blast NR	PM(Da)
630-801	+		+				6561,4351
772-643	+						4988,048
5758-5881		+				+HP	4412,2992
T9B							
8171-8099		+	+				3004,4919
11429-11354	+						2695,2323
11748-11811	+		+				2369,7226
18843-18906		+					2452,9355
27923-27854	+	+	+				2806,2214
28013-27950		+					2424,0296
T4H							
23315-23243		+	+				2781,2354

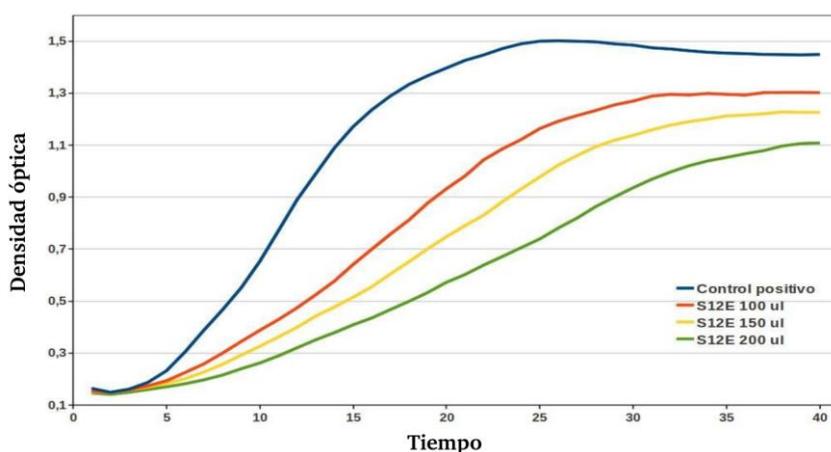
Tabla 3. Posibles péptidos codificados en los fósmidos, detectados mediante la herramienta de predicción de péptidos antimicrobianos (http://metagenomics.uv.es/cgi-bin/gbrowse/Fosmids_AMPs/). Marcados en color naranja los péptidos con mayor probabilidad de causar inhibición. Los signos “+” indican resultados positivos para la presencia de péptidos señal, composición de aminoácidos típica de péptidos antimicrobianos, hidrofobicidad, carga neta positiva, y similitud con péptidos antimicrobianos.

Los resultados obtenidos con esta herramienta se compararon con los obtenidos mediante la anotación, observando coincidencias en tres de ellos (señalados en naranja en la Tabla 3). La utilización combinada de estas herramientas bioinformáticas reveló pues los posibles genes involucrados en la respuesta inhibitoria frente a bacterias cariogénicas, y son objeto de estudio en la actualidad.

6.3.5. Ensayos para la determinación de la dosis mínima inhibitoria.

6.3.5.1. Ensayos para el fósrido S12E

Los ensayos de inhibición realizados con distintas cantidades del sobrenadante obtenido al crecer el fósrido de origen bacteriano S12E mostraron que la inhibición frente a *S. mutans* es dosis dependiente (figura 10), ya que al añadir diferentes cantidades de sobrenadante concentrado (ver apartado 6.2.8.) se observa una inhibición del crecimiento que es mayor conforme aumenta la cantidad añadida. Los datos de absorbancia fueron tomados cada 30 min durante 20 h. En la gráfica se muestra



la media de tres experimentos independientes, tomando como control el crecimiento de *S. mutans* en ausencia de inhibidor.

Figura 7. Curvas de crecimiento de la especie *Streptococcus mutans* (control) en medio HBI, mostrando el crecimiento bacteriano (densidad optica) durante 20 h, con la adición de distintas cantidades de la fracción de 3-10 kD del sobrenadante concentrado del fósrido S12E.

6.3.5.2. Resultados de los ensayos de inhibición de los fósmidos con insertos largos.

Los fósmidos T9B y T4H presentaron inhibición frente a las bacterias cariogénicas en la fracción menor de 3 KDa, mientras que en el fósrido T1F la inhibición se producía con la fracción 3-10 KDa (Tabla 4). En la figura 8 se muestra el efecto inhibitorio de las distintas fracciones del sobrenadante sobre *S. mutans*.

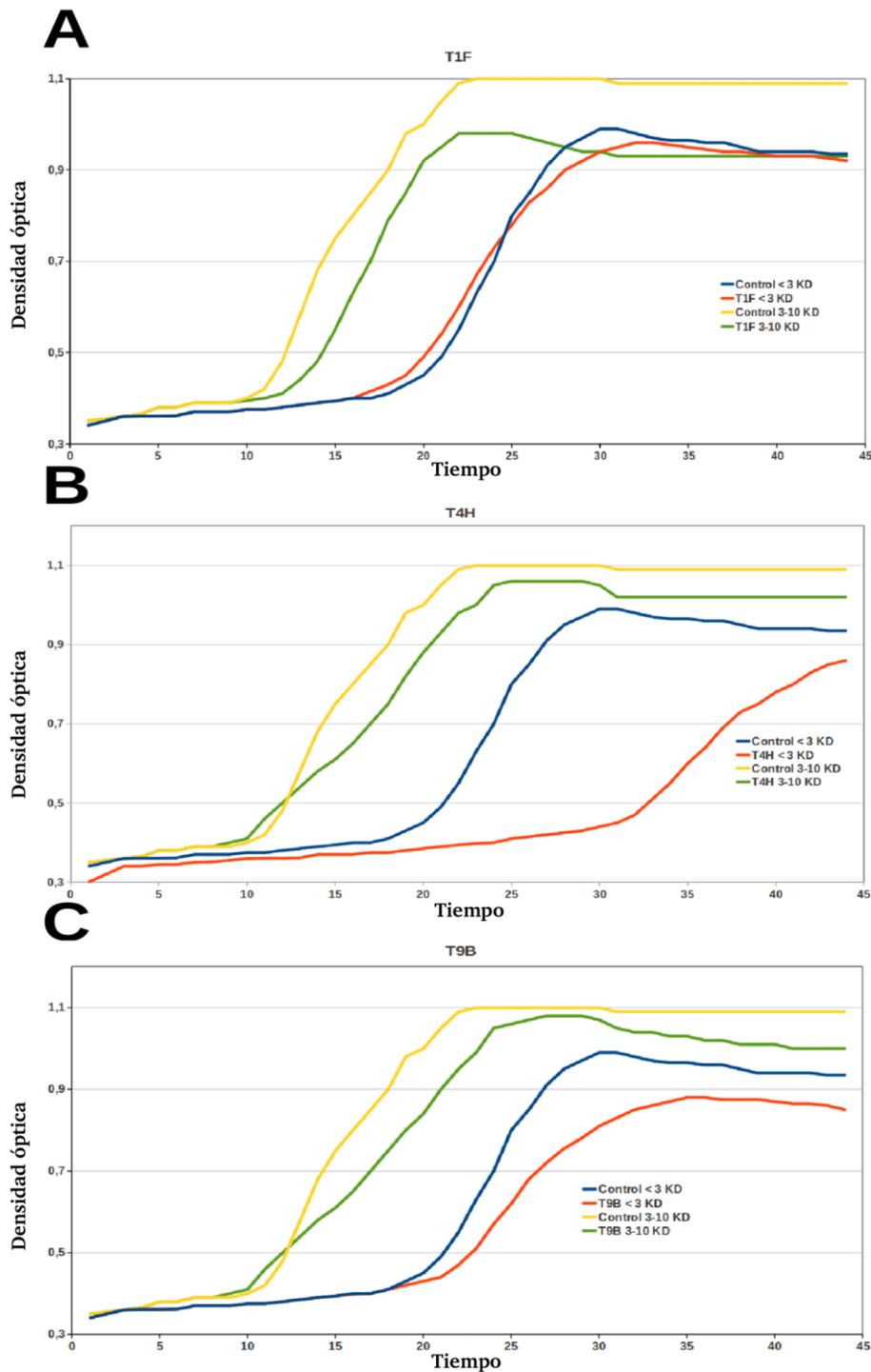


Figura 8. Curvas de crecimiento de *Streptococcus mutans* en medio HBI (control) y en medio HBI suplementado con 50 μ l de las fracciones de 3-10 KDa y menor de 3 KDa del sobrenadante concentrado de los fósridos T1F (A), T4H (B) y T9B (C). Los datos fueron tomados cada 30 min durante 22,5 h. La gráfica muestra la media de tres experimentos independientes.

Nombre del fósido	Origen	Longitud inserto (pb)	Similitud	% de Cobertura	% de identidad	Fracción activa (KDa)
S12E	Bacteriano	666	<i>Propionibacterium pronionicum</i> F023a	100	99	Entre 3 – 10
T1F	Bacteriano	42797	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	54	93	Entre 3 – 10
T4H	Bacteriano	28023	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	5	79	Menor de 3
T9B	Bacteriano	33899	<i>Prevotella dentalis</i>	12	71	Menor de 3
T5A	Humano	232	Cromosoma 1 (86243-86486)	-	-	ND
A4H11	Humano	32622	Cromosoma 5 (67876-100498)	-	-	ND
A5D1	Humano	44763	Cromosoma 1 (17623-62386)	-	-	ND
W4D	Humano	34148	Cromosoma 3 (105000-139000)	-	-	ND
T5H	Humano	27731	Cromosoma 10 (59313-87044)	-	-	ND

Tabla 4. Características de los insertos de los fósidos inhibitorios, tamaño del inserto, resultados obtenidos mediante BLAST frente a la base de datos nr del NCBI, y fracción de tamaño activa.

6.3.6. Comparación de la actividad inhibitoria del fósido S12E frente a Listerine

En la Figura 9 se muestra el efecto inhibitor frente a *S. mutants* del fósido S12E a la dosis testada de 100 μ l del sobrenante del fósido, frente al efecto inhibitor de 100 μ l de Listerine®. El Listerine® es un enjuague bucal con actividad anti-placa dental y antiséptico oral, cuya acción es superada por el fósido S12E.

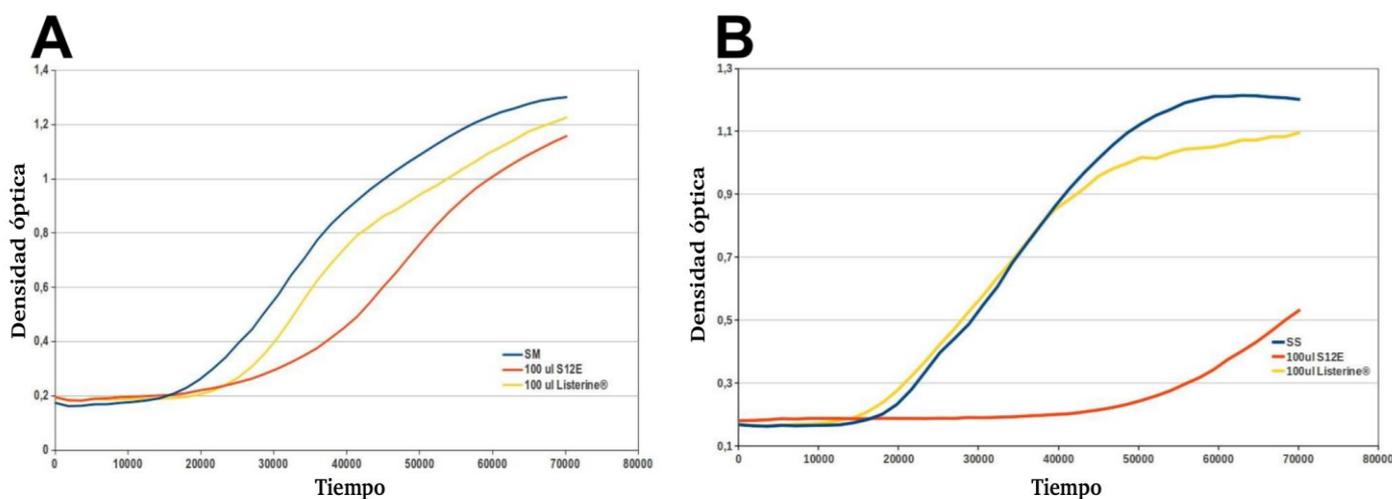


Figura 9. Crecimiento de *S. mutants* (A) y *S. sobrinus* (B) en presencia de Listerine® y del inhibidor S12E. Los resultados muestran la O.D, medida por triplicado, a lo largo de 19 h a 37 °C en medio de cultivo HBI.

Por último todos los fósidos se testaron frente a otras bacterias aerobias pertenecientes a distintos grupos bacterianos como: *Bacillus* CECT40, *Staphylococcus epidermidis* (Firmicutes), *Micrococcus luteus* (Actinobacteria), *Sphingomonas paucimobilis* (Alpha Proteobacteria), *Burkholderia cepacea* (Beta roteobacteria), *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* CECT 101 *Klebsiella pneumoniae*, *ssp pneumoniae* CECT 143 (Gamma Proteobacteria) y *Chryseobacterium aquaticum* (Bacteroidetes). Se obtuvieron resultados negativos en todos ellos, excepto para *Bacillus* CECT40 y *Staphylococcus epidermidis*, que fueron inhibidos con los cuatro fósidos bacterianos. En la actualidad se están llevando a cabo ensayos de actividad frente a un mayor número de especies bacterianas, tanto aerobias como anaerobias, que se sabe están involucradas en el desarrollo de otras patologías orales (gingivitis y periodontitis).

6.3.7. Actividad de los péptidos sintetizados.

Una vez sintetizado el péptido predicho en el apartado 6.2.11 se confirmó su actividad inhibitoria sobre un cultivo de *S. mutans*. Los datos obtenidos mostraron que el péptido tiene un efecto leve sobre el crecimiento de *S. mutans* a la dosis más baja testada (0,03 mg), que aumenta de forma considerable cuando la dosis es 10 veces superior (0,3 mg) (Figura 10).

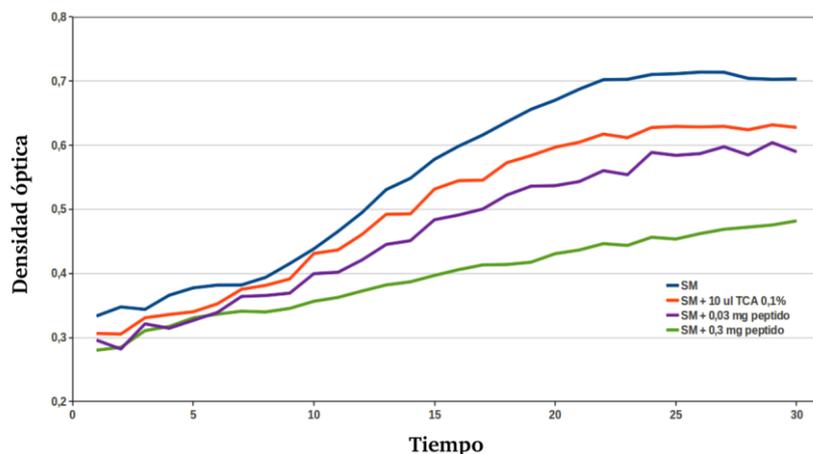


Figura 10. Crecimiento de *S. mutans* en presencia del péptido inhibitor sintetizado químicamente. Los resultados mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes.

6.4. Discusión.

El objetivo principal del presente capítulo fue mejorar el conocimiento de la microbiota que habita en la cavidad oral mediante la aplicación de técnicas metagenómicas, así como diseñar nuevas estrategias para el tratamiento y/o prevención de enfermedades orales, principalmente caries. Para ello se crearon cuatro librerías metagenómicas y se utilizaron técnicas de cribado o “screening” que nos permitieron la búsqueda de inhibidores del crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, dos

de las principales bacterias identificadas como agentes causantes de la caries (Soet JJ. y col. 1991; Napimoga MH. y col. 2005; Loesche WJ. 1986).

Tras la construcción de las librerías metagenómicas se obtuvieron un total de 21696 clones que, después de los cribados descritos anteriormente, permitieron la identificación de nueve fósidos con actividad inhibitoria frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, cuatro de ellos con insertos de origen bacteriano (estudiados en profundidad en esta tesis) y cinco de origen humano (objeto de estudio de otra tesis doctoral).

A la hora de trabajar con metagenotecas de fósidos hay que tener en cuenta que no son librerías de expresión optimizadas, debido principalmente al gran tamaño del inserto que albergan los plásmidos y al bajo número de copias de plásmidos por célula. Por ello, su expresión puede variar de una réplica a otra si las condiciones de inducción a copia múltiple o de crecimiento no son exactamente las mismas. Otro factor a tener en cuenta es que los genes clonados provienen de bacterias muy distintas a *E. coli*, lo que puede dificultar su expresión al no ser reconocidos los promotores presentes en el inserto por la maquinaria transcripcional o traduccional del hospedador. Así pues, es factible que algunos de los clones que dieron actividad antibacteriana en el primer cribado y que resultaron negativos en cribados posteriores contuvieran genes de interés pero que no fueran expresados de forma consistente en *E. coli*.

El efecto inhibitor de los cuatro fósidos con insertos bacterianos varía considerablemente, y es modesto en alguno de ellos, lo que puede deberse a la falta de modificaciones post-traduccionales en nuestro sistema de clonación y expresión, muy comunes en péptidos antimicrobianos (Müller MP. Y col. 2013; Arya T. y col. 2013). También podría deberse a la falta de factores ambientales, como las interacciones bacteria-bacteria o bacteria-huésped (Takahashi K. 2013) que se producen de manera natural en la placa dental.

Estudios previos realizados por nuestro grupo aplicando técnicas de secuenciación masiva han concluido que la microbiota oral de individuos sin caries puede constituir un reservorio de genes con actividad antimicrobiana (Belda-Ferre P. y col. 2012, Alcaraz y col. 2012). Sin embargo, el porcentaje de estos genes sobre el total de la comunidad microbiana es muy bajo, y por tanto el número de clones que deben ser testados en el cribado para poderlos detectar debe ser elevado. Asimismo, si algunos de estos genes tienen actividad tóxica contra el hospedador, la propia célula de *E. coli* no sería viable y no se podrían detectar mediante la utilización de la estrategia utilizada en este trabajo (Ghai R. y col. 2010; Sorek R. y col. 2007). Además de la toxicidad, como se comentó anteriormente, otro motivo para la

ausencia de detección de sustancias de interés en metagenotecas es la dificultad de expresión o traducción de genes extraños en un hospedador como *E. coli*. Gran parte de la microbiota oral está compuesta por grupos taxonómicos muy alejados de las proteobacterias, como son los phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* o TM7, los cuales presentan regiones reguladoras y promotoras muy divergentes de las del hospedador (Lorenz P. y Eck J. 2005; Schmeisser C. y col. 2007). Así pues, es lógico que la proporción de clones detectados con actividad inhibitoria sea extremadamente baja (en torno al 0.4 por mil).

Los cuatro fósmidos que mostraron actividad inhibitoria frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* y que contienen insertos de origen bacteriano fueron completamente secuenciados y anotados. Los resultados mostraron distintos genes que podrían estar involucrados en la respuesta inhibitoria frente a bacterias cariogénicas (tabla anexa 6.1.).

Aunque durante la realización de esta tesis los avances en el estudio de la inhibición del crecimiento de bacterias cariogénicas han sido importantes, no se ha logrado identificar el gen o genes cuyo producto proteico concuerde con el rango de tamaño determinado empíricamente en los fósmidos T1F, T4H y T9B. Sin embargo, los resultados obtenidos sirven de base para estudios que se están llevando a cabo en la actualidad mediante diferentes aproximaciones (mutagénesis dirigida, subclonación de los insertos, proteómica y transcriptómica) para identificar las moléculas responsables de la inhibición. La estrategia a seguir es realizar experimentos de mutagénesis con el fin de inactivar el gen o genes responsables de la inhibición y conocer así su secuencia, o la subclonación de fragmentos más cortos en vectores de expresión para acotar la búsqueda de los genes responsables e intentar optimizar su expresión in vitro (Jones BV. y col. 2008; Roh E. y col. 2010).

En el fósrido S12E, con un pequeño inserto de 666 pb, se identificaron seis posibles candidatos del péptido con actividad antibacteriana. Tras la filtración de su sobrenadante se determinó que la fracción activa era aquella menor de 3 KDa, reduciendo la lista a solamente tres. De estos tres candidatos solamente en uno se identificó péptido señal y una vía de secreción, mediante el programa SECRETOME-P. Como resultado obtuvimos un péptido de 39 aminoácidos como el principal causante de la inhibición de las bacterias cariogénicas. Este péptido presentó una carga neta negativa a pH 7, lo que parece contradictorio con lo descrito para las bacteriocinas conocidas, que suelen presentar una carga neta positiva que les permite la unión a los lípidos de membrana (Chugunov A. y col. 2013; Breukink E. y col. 1997). Sin embargo, el ambiente oral adquiere un pH ácido durante la fermentación de azúcares tras la ingesta de comida. La acidificación del biofilm de la placa dental se produce durante la media hora siguiente a la administración de un enjuague con sacarosa, como

demonstraron Imfeld y Lutz, en 1980, alcanzándose valores de pH de hasta 4, e incluso menores. Dado que el punto isoeléctrico calculado para el péptido S12E es de pH 4.7, éste podría ser funcional a pH ácido (la carga neta a pH 4.5 es de 1.1, y a pH 4 de 3.1). Parece pues que a pH ácidos, cuando mayor es el riesgo de desmineralización del esmalte, este péptido podría ser totalmente funcional y su secreción podría ser importante para la inhibición del crecimiento de bacterias cariogénicas.

La secuencia nucleotídica que codifica para este péptido dio una elevada similitud (99%) con una región del genoma de *Propionibacterium pronionicum* F023a, bacteria típicamente detectada en el nicho oral (ver Capítulo 1). Para confirmar que este péptido es el causante de la inhibición de las bacterias cariogénicas, se sintetizó químicamente y se confirmó su actividad tanto frente a *S. mutants* como frente a *S. sobrinus*. Actualmente se están realizando ensayos de eficiencia de este péptido inhibidor, y ensayos de escalado industrial para su producción, con el fin de utilizarlo como principio activo en productos de higiene oral. Varias empresas del ámbito de la higiene oral están interesadas en la comercialización del producto.

V.

Capítulo 7.

Búsqueda de potenciales probióticos anticaries en aislados de placa dental.

7.1. Introducción

Los microorganismos de la boca pueden causar dos enfermedades principales: la caries y las afecciones periodontales (gingivitis y periodontitis). Uno de los factores más importantes para que se inicie cualquiera de estas patologías en la cavidad oral es la presencia de la placa dental, constituida por un cúmulo de bacterias y productos extracelulares que se adhieren a la película amorfa que hay sobre la superficie limpia del diente, formada principalmente por glucoproteínas salivares. La placa supragingival (en principio aerobia) es principalmente cariogénica y la subgingival periodontopática. No hay por el momento consenso respecto a cuáles son los mecanismos patogénicos y los factores de virulencia específicos de los microorganismos que provocan estas infecciones. Además la complejidad de la comunidad bacteriana de la placa dental ha dificultado la determinación de un agente bacteriano como único responsable de la caries. Sin embargo, hay evidencias de que *Streptococcus sobrinus* y, sobre todo *Streptococcus mutans*, son dos de los microorganismos implicados en la cariogénesis (Loesche WJ. 1986). Estos estreptococos del grupo “Mutans” pueden provocar la caries dental, pero los estreptococos orales comprenden más de 30 especies reconocidas que representan una elevada proporción de la microbiota oral (Wilson M. 2004), algunas de las cuales parecen contribuir a una buena salud dental pues su presencia se ha asociado a condiciones de ausencia de caries (Belda-Ferre P. y col. 2012). Éstos

pertenecen principalmente al grupo “Mitis”, y podrían por tanto tener un potencial probiótico para el tratamiento de la caries (Collado MC. y col. 2012).

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un saludable beneficio al huésped (Piñeiro M. y Stanton C. 2007). Hasta la fecha, no hay evidencias claras de que la alteración de la microbiota oral mediante el uso de probióticos en un ser humano adulto con un buen estado de salud sea beneficiosa para prevenir y/o curar la caries dental. Se sabe que varias bacterias orales, incluyendo *S. mutans* y distintas especies del género *Lactobacillus*, están implicadas en diversas etapas del proceso de la caries dental (Ten Cate JM. y Van Loveren C. 1992; Ozaki K. y col. 1994; Featherstone JD. 2000). De hecho, hay evidencias considerables de que *S. mutans* es el principal agente etiológico de la enfermedad (Tanzer JM. y col. 2001; Kuramitsu HK. 2003; Caufield PW. y col. 2005), si bien otras especies poco estudiadas se encuentran en mayor proporción en lesiones de caries (Simón-Soro y col. 2013). Estudios comparativos de la microbiota oral en individuos sanos y con caries han revelado una gran proporción de especies bacterianas orales con una distribución global, encontrándose en seres humanos independientemente de su raza ó ubicación geográfica, como se ha demostrado para *S. mutans* y *S. sobrinus* (Bratthall D. 1991). La ubicuidad de estas bacterias indica que la evolución y distribución de la microbiota oral puede ser independiente de diferencias culturales o de hábitos alimenticios y de higiene. Contrariamente, existen especies con una distribución restringida, como es el caso de *S. rattus* (Hyink O. y col. 2005), lo que sugiere que éstas tienen una capacidad reducida para colonizar y sobrevivir en la cavidad oral.

Se sabe que un desequilibrio en la composición de la comunidad bacteriana de la placa supragingival debido a cambios en las condiciones ambientales locales puede causar caries dental (Marsh PD. y col. 2010), ya que puede producir un aumento de la proporción de microorganismos causantes de la enfermedad (Takahashi N. y Nyvad B. 2008). La comparación de la composición taxonómica bacteriana entre muestras de individuos sanos y enfermos por técnicas de secuenciación masiva ha sido muy útil para determinar cuáles son los microorganismos relacionados con el desarrollo de enfermedades orales y cuáles están asociados a condiciones de salud (Paster BJ. y col. 2001, Belda-Ferre P. y col. 2011; Alcaraz y col. 2012).

En los últimos años se ha propuesto el uso de ciertos microorganismos para restablecer el equilibrio de la microbiota en distintos nichos del cuerpo humano. Muchas de las cepas utilizadas como probióticos producen inhibidores de los agentes patógenos, como bacteriocinas u otros agentes antimicrobianos, lo que les confiere un efecto terapéutico (Burton JP. y col 2013). Quizá el ejemplo más conocido de utilización de probióticos sea la ingestión de cepas de *Bifidobacterium*, que suministradas en

yogurt pueden ayudar al tránsito intestinal. Otro menos conocido es el suministro de cepas inocuas de *Streptococcus salivarius*, que puede prevenir la faringitis causada por otros *Streptococcus* (Ross KF. y col. 1993).

En cuanto a la microbiota oral, la administración de cepas avirulentas de *S. mutans* parece ser beneficiosa para el tratamiento de la caries (Hillman JD. y col. 1998; 2000). También se han testado otras especies, como *Streptococcus rattus* (filogenéticamente muy cercana a *S. mutans*), y que parece competir con *S. mutans* por los puntos de adhesión al diente, los nutrientes y otros aspectos en el proceso de colonización de la placa dental (Hillman JD. Y col. 2009). La estrategia de modificar el ambiente oral hacia mejores condiciones de salud mediante la implantación deliberada de aislados orales específicos que inhiben el crecimiento o evitan el asentamiento de especies o cepas virulentas, se conoce con el término de “terapia de reemplazo” (Tagg JR. y Dierksen KP. 2003).

Para que una especie bacteriana (probiótico) tenga éxito en la terapia de reemplazo de una enfermedad de origen bacteriano debe cumplir una serie de requisitos básicos: i) no debe causar la enfermedad, ii) debe colonizar persistentemente el tejido del huésped en riesgo, previniendo la colonización por el patógeno. En las situaciones en las que el patógeno forma parte de la microbiota autóctona, el probiótico debe tener capacidad para desplazarlo; iii) el probiótico debe poseer un alto grado de estabilidad genética, por lo que es deseable que no esté sometido a manipulaciones genéticas. Esta última premisa ha significado un problema en estudios previos en los que se ha propuesto la utilización de cepas modificadas genéticamente con propiedades mejoradas ("probióticos de diseño"). Por ejemplo, cepas recombinantes de *S. mutans* con capacidad acidogénica reducida (Hillman y col. 1998; 2000), o cepas recombinantes de *Lactobacillus* que expresan anticuerpos dirigidos a una de las adhesinas mayoritarias de *S. mutans* (Caglar E. y col. 2005). Otras cepas modificadas genéticamente de *Lactobacillus* se han comercializado como agentes coagregantes de *S. mutans*, incluso cuando la cepa se administra inerte, presumiblemente contribuyendo a eliminar la bacteria cariogénica al impedir su adhesión a la placa dental (Tanzer JM. Y col. 2010).

Las técnicas de cultivo han sido ampliamente utilizadas para analizar las comunidades bacterianas asociadas a distintos nichos del cuerpo humano en condiciones de salud y enfermedad (Socransky SS. y col 1971; Zee KY. y col 1996) pero actualmente, con el desarrollo de la nueva generación de técnicas de secuenciación masiva (NGS) y su uso en estudios no dependientes de cultivo, se ha revitalizado la investigación sobre el microbioma humano (Turnbaugh PJ. y col. 2007; Dethlefsen L. y col. 2007), incluyendo el de la cavidad oral (Zaura E. y col. 2008, Belda-Ferre P. y col. 2012). Tradicionalmente, el estudio de las bacterias que habitan en la cavidad oral se ha visto obstaculizada por

la baja proporción de especies que se pueden cultivar mediante las técnicas clásicas de cultivo (Suau A. y col. 1999). En el estudio publicado en 2012 por Belda-Ferre y colaboradores se observó una sobre-representación de una especie de *Streptococcus* del grupo mitis-oralis-sanguis en individuos que nunca habían tenido caries respecto a voluntarios con caries en el pasado. Con los datos obtenidos en este trabajo iniciamos la búsqueda de nuevas especies bacterianas en el nicho oral mediante técnicas clásicas de cultivo, focalizándonos en especies pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Neisseria*. Para ello, se obtuvieron aislados procedentes de individuos con y sin caries que fueron identificados mediante la secuenciación de los genes ribosómicos 16S ARNr. Posteriormente se seleccionaron aquellas cepas que presentaban actividad inhibitoria frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* y se caracterizó el mecanismo de la inhibición. El resultado fue la obtención de una colección de aislados con potencial probiótico y la descripción de una nueva especie del género *Streptococcus* (*Streptococcus dentisani* sp. nov., Camelo-Castillo A. y col. 2013).

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Obtención de muestras.

Se obtuvo placa dental supragingival de 10 voluntarios después de firmar el consentimiento informado. El procedimiento de muestreo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Dirección General de Salud Pública de la Generalitat Valenciana. El estado de salud bucal de cada voluntario fue evaluado por un dentista siguiendo las recomendaciones y la nomenclatura de las encuestas de salud bucodental de la OMS (Green JC. and Vermillion JR. 1960). Se seleccionaron cinco voluntarios que nunca habían padecido caries (índice CAO igual a 0), y otros cinco con caries en el pasado, pero siendo la presencia de lesiones de caries cavitadas criterio de exclusión, al igual que si habían tomado antibióticos durante los tres meses anteriores a la fecha de la toma de muestras. Otros criterios de inclusión fueron una edad superior a 18 años y la conservación de todas las piezas dentales en el momento de la toma de muestras. A los voluntarios seleccionados se les tomó una muestra de placa dental supragingival con una micro cucharilla odontológica estéril, accediendo a la placa dental de los incisivos, caninos, molares y premolares por ambas superficies libres, evitando los espacios interdentes. Se pidió a los voluntarios no cepillarse los dientes durante las 24 horas antes de la toma de muestras. Se obtuvo información sobre la higiene oral, dieta y signos de enfermedad periodontal de cada voluntario (Tabla 1).

Voluntario	Género	Edad	Presencia de caries	CAO	Cepillado	Enfermedad periodontal
NoCA_04	Mujer	37	No	0	0 / día	Enrojecimiento. Sangrado provocado
NoCA_010P	Mujer	42	No	0	1 / día	Encía sana
NoCA_03P	Hombre	39	No	0	2 / día	Encía sana
NoCA_00P	Mujer	31	No	0	2 / día	Encía sana
NoCA_01P	Hombre	25	No	0	2 / día	Inflamación leve
CA005	Mujer	42	Si	0,38	1 / día	Inflamación leve
CA017	Hombre	18	Si	0,78	2 / día	Inflamación leve
CA1_002P	Hombre	30	Si	0,21	1 / día	Inflamación leve
CA004	Mujer	36	Si	0,89	0 / día	Ulceración. Sangrado espontáneo.
CA1_01P	Hombre	38	Si	0,68	1 / día	Inflamación leve

Tabla 1. Datos clínicos de los voluntarios.

7.2.2. Aislamiento y cultivo de cepas de la placa dental supragingival.

Basándonos en estudios previos de cultivo de muestras orales (Tian Y. Y col. 2010) se seleccionaron seis medios de cultivo diferentes para tomar la mayor diversidad bacteriana posible. Los medios de cultivo seleccionados fueron: agar sangre (AS, Pronadisa), agar chocolate (Ach, Pronadisa), Luria-Bertani (LB, Pronadisa), infusión cerebro corazón (BHI, Pronadisa), agar Brucella (AB, Pronadisa), y agar triptófano soja (ATS, Pronadisa).

Todos los medios se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante. Se sembraron por agotamiento las muestras tomadas de cada voluntario, utilizando 12 placas por cada voluntario (dos placas por cada medio de cultivo). Todas las placas se incubaron en condiciones aerobias a 37 °C, favoreciendo de esta forma el aislamiento de colonizadores tempranos de la placa dental, que es eminentemente aerobia, y entre los que se encuentran los estreptococos. La mitad se incubó durante 24 horas y la otra mitad durante 72 horas, para aislar las especies de crecimiento más lento.

Tras el período de incubación, se seleccionaron las colonias en base a la morfología colonial (tamaño, forma y pigmentación de las colonias) y celular (mediante observación con microscopía

óptica). Se seleccionaron principalmente células con morfología de estreptococo (para aumentar la posibilidad de encontrar especies del género *Streptococcus*) o diplococo (para aumentar la posibilidad de encontrar especies del género *Neisseria*), pues especies pertenecientes a estos géneros se han propuesto como asociados a condiciones de salud (Belda-Ferre P. y col. 2012). Para la obtención de cultivos puros, los aislados seleccionados se resembraron en placas conteniendo el mismo medio de cultivo en el que habían crecido inicialmente. Asimismo, se comprobó su crecimiento en medio BHI para utilizarlo en los experimentos de inhibición, ya que es el medio óptimo para el crecimiento de *S. mutans* y *S. sobrinus*.

7.2.3. Identificación taxonómica de los aislados

Se tomaron 1,5 ml de cultivo puro y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos para recoger la biomasa. El ADN extrajo con el kit de Qiagen “AllPrep ADN/RNA Mini Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante y añadiendo un paso previo de tratamiento con lisozima. Una vez extraído el ADN, su concentración se midió con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Fisher Scientific), comprobando además su pureza mediante el ratio de absorbancia 260/280 nm. Los aislados se almacenaron en crioviales de 1,5 ml a -80°C en glicerol al 19%. Para cada uno de los aislados se amplificaron mediante PCR los genes ribosómicos 16S ARNr, utilizando dos cebadores universales para el dominio *Bacteria*: 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1509R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Se utilizó la polimerasa de AB-Gene Thermoprime Plus DNA Polimerase (Thermo Scientific), una temperatura de hibridación de 58°C y un total de 30 ciclos. El producto de PCR se purificó mediante el kit de Roche “High Pure PCR Product Purification Kit” y se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Fisher Scientific). Para la obtención de la secuencia completa de los amplicones se utilizaron cuatro cebadores (27F, 1509R, 758R [5'-CTACCAGGGTATCTAATCC-3'] y 758F [5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3']).

Las secuencias obtenidas para cada aislado se ensamblaron y procesaron con el paquete Gap4 que forma parte del programa Staden (Staden R. y col. 2000). Las secuencias casi completas se asignaron taxonómicamente mediante BLAST contra la base de datos nr del NCBI (Altschul SF. y col. 1990)

7.2.4. Pruebas de inhibición de los aislados frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

7.2.4.1. Búsqueda de actividad antimicrobiana.

Para las pruebas de inhibición se cultivaron *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en placas con medio BHI. En primer lugar se cultivaron en medio líquido colonias aisladas de ambas especies. Tras 12-16 horas de incubación se sembraron 250 µl en medio BHI sólido para obtener un crecimiento en tapiz. Tras 20 minutos, se depositaron 2 µl de un cultivo crecido (D.O.= 0.8) de cada uno de los aislados a testar. Las placas se incubaron a 37°C en aerobiosis. Tras 24 horas se visualizaron las placas en busca de halos de inhibición (Figura 1).



Figura 1. Prueba de inhibición de cuatro de los aislados obtenidos en el muestreo sobre un tapiz de *S. mutans*. Dos de los aislados (arriba y a la izquierda) producen halos de inhibición sobre la especie testada.

7.2.4.2. Producción de peróxido y/o péptidos antibacterianos de los aislados.

Para todos los aislados que produjeron inhibición contra las especies testadas se realizaron las siguientes pruebas:

- Producción de peróxido: tras 24 h de incubación en medio sólido de la cepa a testar se añadieron 10-15 µl de peroxidasa (64 µg/ml) a un lado de cada colonia productora de inhibición y 10-15 µl de tampón PBS al otro lado. Posteriormente se inocularon 5 µl de las cepas sensibles (*S. mutans* y/o *S. sobrinus*) a derecha e izquierda, tal y como se describe en trabajos previos (Kreth J. Y col. 2005 y Zhu L. y col. 2012). Como controles se utilizaron cepas de *S. sanguis* (productor de H₂ O₂, control positivo) y *S. mutans* (no productor y sensible a la presencia de H₂ O₂, control negativo). Si la cepa a testar es productora de H₂ O₂ se observa al instante un ligero burbujeo, y a las 24 horas no se observan halos de inhibición.

- Prueba de la proteinasa K: tras 24 h de incubación en medio sólido de las cepas a testar se añadieron 10-15 μ l de proteinasa K (70 μ g/ml) y 10-15 μ l de PBS a cada lado de las colonias. Posteriormente se inocularon 5 μ l de las cepas sensibles a derecha e izquierda, tal como se describe en Kreth J. Y col. 2005 y Zhu L. y col. 2012. Tras la incubación a 37°C durante 24 horas, se visualizaron las placas, siendo la ausencia de halos indicativa de que la inhibición es causada por moléculas de naturaleza peptídica. Se utilizó *S. sanguis* como control negativo, ya que se sabe que no produce bacteriocinas y de *S. mutans* como control positivo, productor de bacteriocinas, en concreto mutacina (Kreth J. Y col. 2005).

7.2.5. Determinación de la fracción inhibidora de los aislados.

Los aislados que produjeron inhibición se crecieron en medio BHI líquido. Para obtener el sobrenadante, se centrifugaron 50 ml de cultivo durante 10 min a 10.000 rpm. Los sobrenadantes fueron filtrados secuencialmente por filtros de tamaño de poro de 0.2 μ m y columnas Amicon ultra de 100 Kda, 10 Kda y 3 Kda (Figura 2), obteniendo así cuatro fracciones de tamaño: mayor de 100 KDa, entre 100-10 KDa, entre 10-3 KDa, y menor de 3 KDa.

Las tres fracciones filtradas y concentradas, junto con la menor de 3 Kda, que se concentró mediante rotavapor, se utilizaron para testar la inhibición frente a un tapiz de *S. mutans* y *S. sobrinus* (Figura 2). De esta manera se comprobó si la inhibición del crecimiento de las bacterias cariogénicas testadas se producía mediante un compuesto secretado al exterior de la célula y cuál de las fracciones mostraba la mayor actividad, obteniendo el rango de tamaño de los compuestos inhibidores.

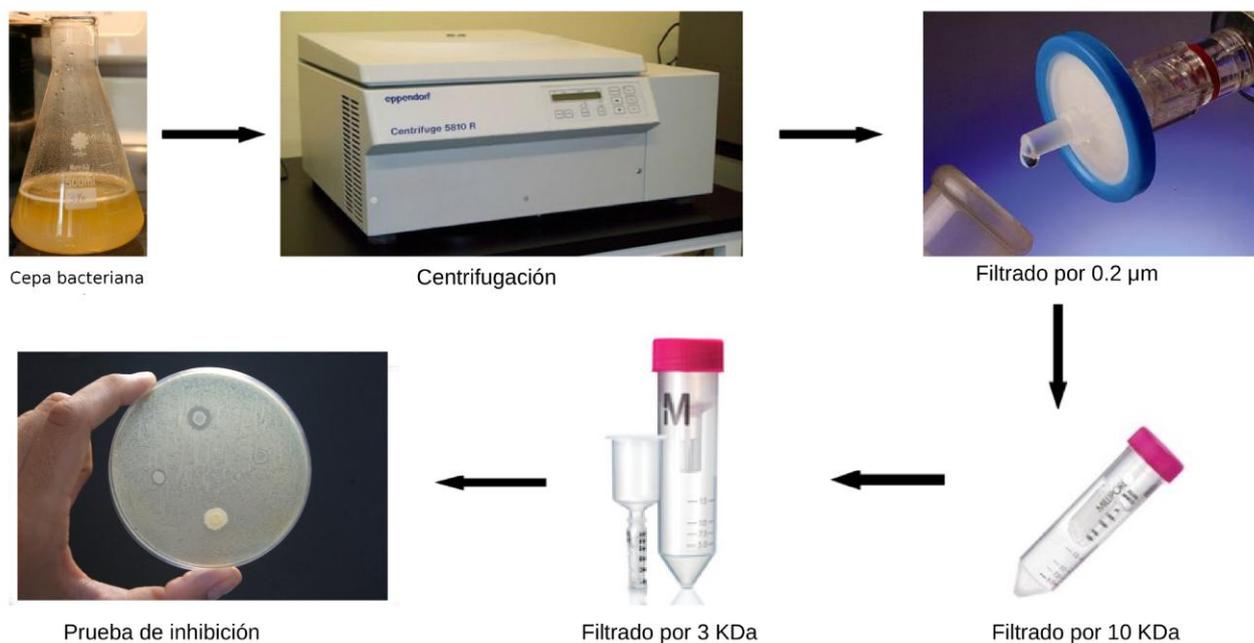


Figura 2. Proceso de filtración del sobrenadante de cada uno de los aislados inhibitorios.

Resultados

7.3.1. Aislados de placa dental supragingival.

Se obtuvieron un total de 406 aislados, 214 procedentes de muestras de voluntarios con caries en el pasado y 192 de voluntarios sin caries. Principalmente se aislaron bacterias con morfología de coco y diplococo (como *Streptococcus* y *Neisseria*), aunque también se aislaron bacilos (como *Corynebacterium* y *Lactobacillus*). El medio de cultivo que resultó más eficaz para cultivar estas bacterias orales fue el medio BHI (127 aislados), mientras que con los medios AB, AS, Ach, LB y ATS se obtuvieron 56, 75, 61, 33 y 54 aislados respectivamente.

Los 406 aislados obtenidos se asignaron taxonómicamente mediante la comparación de las secuencias casi completas de los genes ribosómicos 16S ARNr con la base de datos nr del NCBI. Las especies que se encontraron en mayor proporción fueron las pertenecientes al género *Streptococcus*, que constituyeron un 76% de los aislados en el grupo de individuos sin caries y un 62% de los aislados en el grupo de individuos con caries. A nivel de género, los aislados fueron asignados, por orden de frecuencia, a los géneros *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus*. Las especies bacterianas que mostraron una mayor similitud con las secuencias de los aislados (en todos los casos > 97%) fueron las siguientes: *Corynebacterium durum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria sp.*, *Neisseria subflava*, *Neisseria oralis*, *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa*; *Staphylococcus epidermidis*; *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus genomospora*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus vestibularis*.

La asignación taxonómica a nivel de especie mostró diferencias notables entre los aislados procedentes de los distintos voluntarios. En la figura 3 se observa una elevada heterogeneidad entre individuos, suavizándose estas diferencias cuando se comparan los dos grupos estudiados (dos últimas columnas de la figura 3). La diversidad obtenida a partir de las muestras de los voluntarios sin caries fue mucho mayor (25 especies) que en voluntarios con caries en el pasado, de los que se obtuvieron 15 especies bacterianas distintas. Las especies que diferencian ambos grupos son *Corynebacterium durum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria oralis*, *Rothia mucilaginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus anginosus* y *Streptococcus vestibularis*, que únicamente se aislaron en individuos sin caries (Figura 3).

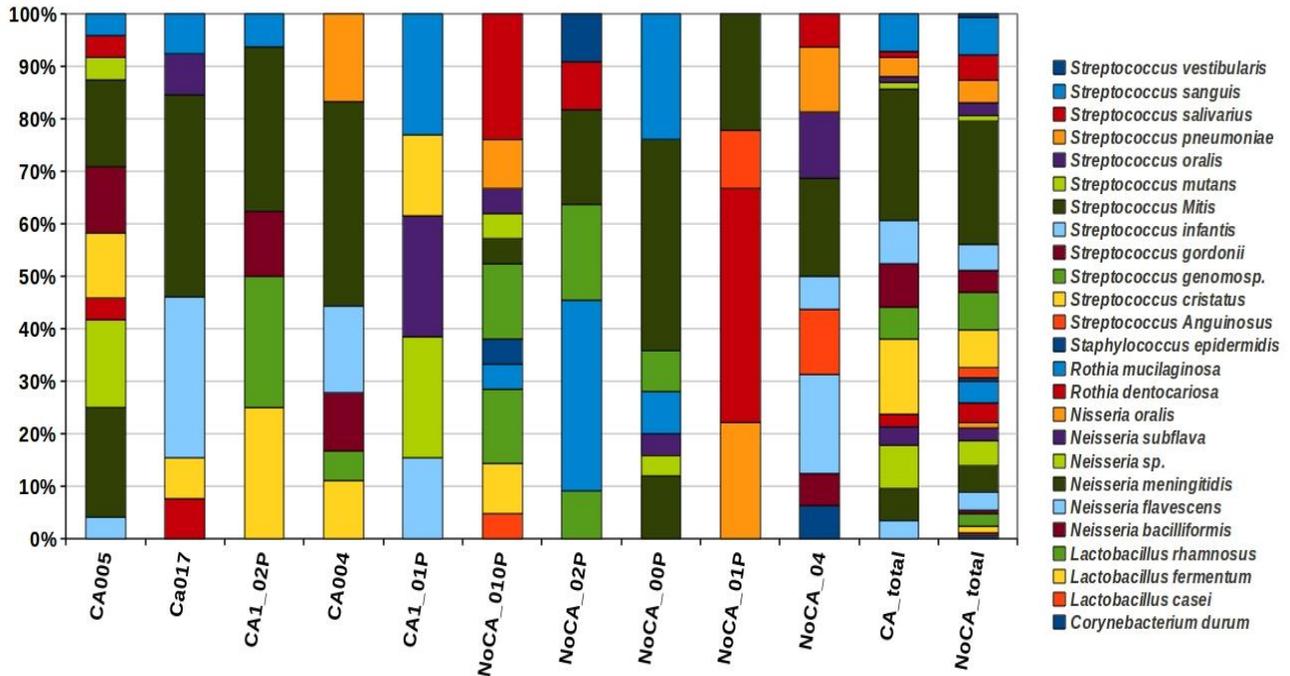


Figura 3. Especies bacterianas aisladas de placa dental supragingival de los distintos voluntarios, y comparación entre los dos grupos (CA_total y NoCA_total). Se muestra el porcentaje de secuencias asignadas a especies con máxima similitud en la base de datos RDP. Los aislados fueron asignados antes de que *Streptococcus dentisani* fuera identificada como nueva especie (Camelo-Castillo A y col 2014). Si la asignación se hiciese en este momento 16 de los 192 aislados de voluntarios libre de caries se afiliaría a esta nueva especie.

7.3.2. Búsqueda de actividad inhibitoria de los aislados frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

Se obtuvieron aislados positivos frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* en ambos grupos del muestreo, es decir tanto en voluntarios con caries como en voluntarios que nunca habían padecido la enfermedad, aunque en proporciones distintas (Tabla 2). Alrededor del 15% de los aislados produjeron la inhibición del crecimiento de *S. mutans*, de los cuales menos de un 5% tuvo efecto inhibitorio también frente a *S. sobrinus*. En la figura 4 se muestra un ejemplo de inhibición frente a *S. mutans* (a derecha e izquierda), así como aislados sin efecto inhibitorio (arriba y abajo).



Figura 4. Aislados de placa dental supragingival que muestran inhibición frente a *S. mutans* (a derecha e izquierda), así como aislados sin efecto inhibitorio (arriba y abajo).

Voluntario	Presencia de caries	Aislados	Positivos frente SM	Positivos frente SM y SS
NoCA_04	No	32	11 (34,37%)	0
NoCA_010P	No	40	3 (7,5%)	2 (5%)
NoCA_02P	No	41	4 (9,75%)	0
NoCA_00P	No	56	8 (14,28%)	1 (1,78%)
NoCA_01P	No	23	3 (13,04%)	1 (4,35%)
CA005	Si	25	7 (28%)	1 (3,45%)
CA017	Si	41	6 (14,63%)	5 (12,19%)
CA1_02P	Si	57	10 (17,54%)	1 (1,75%)
CA004	Si	33	5 (15,15%)	1 (3,03%)
CA1_01P	Si	58	8 (13,79%)	7 (12,07%)
Grupo NoCA	No	192 (47,29%)	29 (7,14%)	4 (0,98%)
Grupo CA	Si	214 (52,71%)	36 (8,86%)	15 (3,72%)

Tabla 2. Resultados obtenidos tras el aislamiento de microorganismos de placa dental supragingival de los diez voluntarios y su posterior cribado frente a *S. mutans* (SM) y *S. sobrinus* (SS).

7.3.3. Producción de péptidos y/o peróxido.

De los 406 aislados obtenidos, 65 produjeron inhibición frente a *S. mutans*, 21 frente a *S. sobrinus* y 19 frente a ambas especies (Tabla 3). Con todos los aislados que mostraron inhibición frente a *S. mutans* (aunque no mostrasen inhibición frente a *S. sobrinus*), se realizó la prueba de la proteinasa K y de la peroxidasa, tal como se describe en el apartado de materiales y métodos (7.2.4.). Esta prueba indica si la inhibición producida por el aislado es debida a la producción de una molécula peptídica o a la acción del peróxido de hidrógeno ($H_2 O_2$), características comúnmente encontradas en *Streptococcus* de la cavidad oral (Kreth J. Y col. 2005; Zhu L. y col. 2012). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Voluntario	Presencia de caries	Aislados testados	Peroxidasa	Proteinasa K
NoCA_04	No	11	9	1
NoCA_010P	No	3	0	2
NoCA_02P	No	4	1	3
NoCA_00P	No	8	6	1
NoCA_01P	No	3	2	1
CA005	Si	7	7	0
CA017	Si	6	5	1
CA1_02P	Si	10	8	0
CA004	Si	5	4	0
CA1_01P	Si	8	6	1

Tabla 3. Numero de aislados cuya inhibición sobre *S. mutans* y *S. sobrinus* se interrumpe tras la adición de proteinasa K y/o peroxidasa. Los aislados cuyos resultados en estas pruebas fueron negativos deben presumiblemente producir inhibición mediante otro tipo de actividad distinta a la peroxidasa o los péptidos antimicrobianos.

De los 65 aislados testados, 53 produjeron inhibición mediante la producción de peróxido de hidrógeno, ya que al añadir peroxidasa la inhibición sobre *S. mutans* y *S. sobrinus* dejaba de producirse. Los 12 restantes produjeron inhibición mediante moléculas de tipo peptídico (Figura 5). Se eliminó del estudio uno de estos doce aislados, ya que la asignación taxonómica lo afilió a la especie *S. mutans*. De estos once, solamente seis produjeron también inhibición frente a *S. sobrinus*.

La asignación taxonómica basada en la secuencia completa del gen ribosómico 16S ARNr de estos seis aislados reveló que todos pertenecían al género *Streptococcus*, afiliándose a cuatro especies diferentes: *S. oralis* (98% de similitud; 7773), *S. mitis* (98% de similitud; 7746), *S. mitis* (97% de similitud; 7775) y *S. mitis* (96% de similitud; 7747). Las cepas se depositaron en la colección española de cultivos tipo (CECT) con los nombres 7746, 7747, 7773 y 7775. Este depósito se realizó debido a su interés terapéutico y comercial, y como requisito para su protección mediante patente.



Figura 5. Pruebas de peroxidasa y proteinasa K en el aislado 7747, que posteriormente fue clasificada como perteneciente a una nueva especie (*Streptococcus dentisani* sp. nov.). La inhibición parece ser causada por una molécula de naturaleza peptídica y no por peróxido de hidrógeno, ya que inhibe en presencia de peroxidasa pero no inhibe en presencia de proteinasa K.

La reconstrucción filogenética de las secuencias obtenidas de los genes 16S ARNr de las cepas 7773, 7774, 7746 y 7747 (longitud >1400 pb) mediante el método de máxima verosimilitud (ML) reveló la agrupación de las mismas con especies del género *Streptococcus* pertenecientes al grupo mitis, tales como *S. infantis*, *S. oralis*, *S. peroris*, *S. mitis* y *S. pneumoniae* (Anexo 7.1). Mientras que la cepa 7773 se afilió claramente a la especie *S. oralis*, las cepas 7775, 7746 y 7747 formaron un cluster independiente dentro del grupo, lo que parecía indicar su pertenencia a una misma especie del género *Streptococcus* no descrita hasta entonces. Para la descripción de la nueva especie se seleccionaron las cepas 7746 y 7747, ya que fueron las que presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre *S. mutans* y *S. sobrinus*. El estudio genotípico y fenotípico de estas dos cepas llevó a la descripción de la nueva especie *Streptococcus dentisani* *sp. nov.* (Camelo y col. 2013).

7.3.4. Fracción activa de los aislados positivos frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

De los cuatro aislados que presentaron inhibición frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* mediante compuestos de naturaleza proteica (7746, 7747, 7773 y 7774) se seleccionaron los dos que produjeron los mayores niveles de inhibición (7746 y 7747)) para determinar la fracción de tamaño activa del sobrenadante.

Como se muestra en la figura 6, las fracciones de 3-10 kDa y >10 kDa del sobrenadante mostraron un efecto beneficioso sobre el crecimiento de *S. mutans*, provocando un incremento del crecimiento respecto al control (Figura 6A y 6B). La fracción que produjo inhibición fue la menor de 3 KDa (Figura 6A y 6B), lo que sugiere que la capacidad de inhibición de estas cepas se debe a la secreción de péptidos de bajo peso molecular, como es característico de las bacteriocinas.

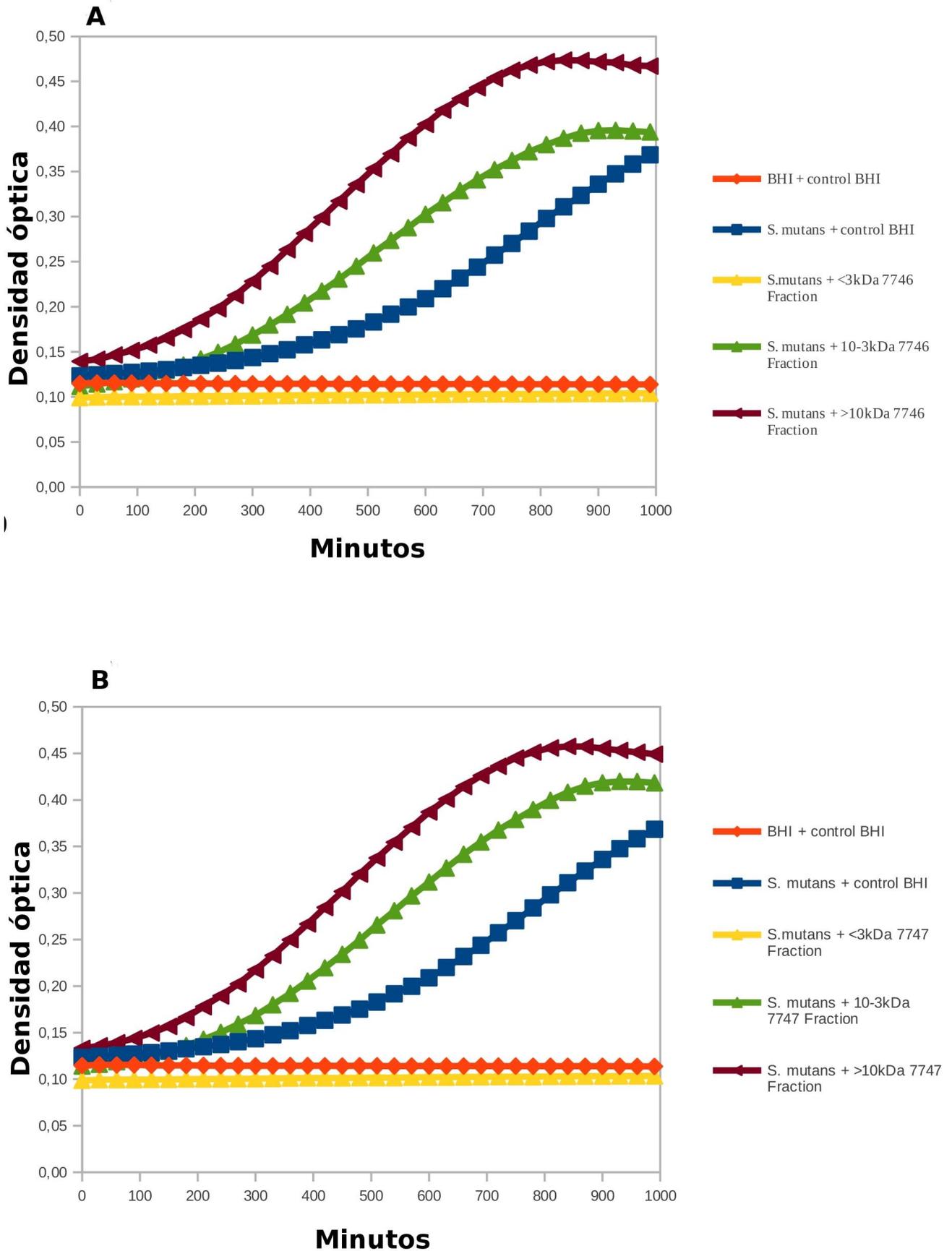


Figura 6. Determinación de la fracción inhibitoria del crecimiento de *S. mutans* en los sobrenadantes de las cepas A) 7746 y B) 7747 de *Streptococcus dentisani*.

7.4. Discusión

La caries dental es una enfermedad infecciosa causada por diferentes organismos acidogénicos entre los que se encuentran *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (Loesche WJ. 1996). Hasta la fecha, la única forma efectiva de combatir la enfermedad pasa por una buena higiene dental, ya que el uso de antibióticos para tratarla puede favorecer otro tipo de infecciones (por ejemplo fúngicas), además de resultar poco efectivo, pues la placa dental tiene las propiedades de un biofilm (Zijng V. y col. 2010). Los biofilms orales contienen tanto una alta densidad como diversidad de especies microbianas (Hamilton IR. y col. 2000), siendo su estructura muy heterogénea (Carlsson P. 1989). Las bacterias en un biofilm tienen una fisiología diferente de la de las células planctónicas. Por lo general, viven bajo la limitación de nutrientes y, a menudo en un estado latente, y responden de manera diferente a los antibióticos y antimicrobianos, ya que estos agentes fueron seleccionados generalmente en experimentos con bacterias metabólicamente activas, siendo una explicación de por qué los antibióticos y antimicrobianos no son tan exitosos en la clínica como podría esperarse a partir de estudios de laboratorio (ten Cate JM. 2006). Por ello se hace necesario encontrar otras estrategias para el tratamiento de la caries dental, entre las que se han sugerido la inmunización activa o pasiva (Abiko Y. y col. 2001), la utilización de péptidos antimicrobianos derivados de cepas bacterianas (capítulo 6), la inhibición de la adhesión celular de las bacterias cariogénicas a la placa dental (Olson GA. Y col. 1972), reduciendo la acidogenicidad mediante tratamiento con maltitol ó xilitol (Thabuis C. y col. 2013), o la búsqueda de probióticos que favorezcan o restablezcan la salud oral (Belda-Ferre y col. 2012; Stensson M. y col. 2013). Pero dada la gran proporción y diversidad de especies bacterianas no cultivables en la cavidad oral (Siqueira JF. y col. 2013), la posibilidad de que algunas puedan constituir una fuente de potenciales nuevos fármacos debe ser explorada mediante las nuevas tecnologías moleculares y de secuenciación masiva (Singh BK. y col. 2010).

En el presente capítulo se obtuvo una colección de aislados de placa dental supragingival de distintos voluntarios para intentar aislar especies sobre-representadas en individuos que nunca habían tenido caries respecto a voluntarios con caries en el pasado, pues tales especies podrían tener un efecto antagonista sobre las bacterias cariogénicas, bien por una ventaja competitiva o por producción de inhibidores contra estas bacterias (Xie H. y col. 2000). Dado que nuestros estudios metagenómicos mostraron que algunas de las especies bacterianas que se encontraban con mayor frecuencia en individuos sin caries pertenecían a los géneros *Streptococcus* y *Neisseria* (Belda-Ferre P. y col. 2012), las colonias obtenidas se observaron al microscopio óptico para seleccionar aquellas con morfología de

coco ó diplococo para su identificación molecular. Efectivamente, la secuenciación del gen 16S ARNr de todos los aislados de placa dental supragingival reveló la presencia de varios aislados de *Streptococcus* (con máxima similitud a *S. mitis* y *S. oralis*) y *Neisseria* (con máxima similitud a especies orales no cultivadas). Para comprobar si estas bacterias producían algún tipo de inhibición sobre las bacterias cariogénicas se realizaron ensayos de inhibición frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, encontrando varias cepas de *Streptococcus* que producían un claro halo de inhibición en cultivo sólido (Figura 3). Se realizaron pruebas de peroxidasa y proteinasa K a todas las cepas inhibidoras, a fin de esclarecer si el mecanismo de inhibición estaba mediado por péptidos antimicrobianos o por producción de peróxido de hidrógeno (Kreth J. y col. 2005). Once de las 406 cepas aisladas produjeron inhibición mediante la producción de moléculas peptídicas (7 de ellas aisladas de individuos sin caries). Cuatro de estas once cepas, procedentes de individuos sin caries y que producían inhibición tanto frente a *S. mutans* como frente a *S. sobrinus*, se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el tratado de Bucarest a fin de proteger su uso comercial como potenciales probióticos. Dos de estas cepas (7746 y 7747), que produjeron mayor grado de inhibición frente a las dos especies testadas, fueron caracterizadas para la descripción de la nueva especie *S. dentisani* sp. nov. (Camelo y col. 2013), cuyo potencial probiótico está siendo testado actualmente.

Mediante estudios de reclutamiento (Belda-Ferre y col. 2011a; Camelo-Castillo, tesis de máster, 2012) se comprobó que *Streptococcus dentisani* se encuentra en el 98% de los 118 metagenomas de individuos sin caries disponibles en el Consorcio Internacional del Microbioma Humano (The Human Microbiome Project Consortium, 2012), sugiriendo que se trata de una especie comensal en individuos sanos. Los reclutamientos metagenómicos consisten en comparar las secuencias de ADN extraídas de un ambiente con las secuencias de genomas de especies de referencia (Coleman ML. Y col. 2006), lo que da una idea de la proporción de la/s especie/s de referencia en una muestra (mediante el grado de cobertura o densidad de puntos en el gráfico obtenido) y de la presencia de la misma especie o especies similares (mediante la detección de secuencias génicas que presenten un 99-100% de similitud con los metagenomas). En los reclutamientos se observó asimismo que otra especie del género *Streptococcus* propuesta como potencial probiótico, *S. salivarius*, estaba presente en tan sólo 3 de los 118 individuos, indicando que dicha especie no habita las superficies dentales. Esto es consistente con trabajos previos que han detectado esta especie en mucosa oral, indicando que su potencial efecto beneficioso se vería enormemente reducido al no poder ejercerlo sobre el sitio donde tiene lugar la enfermedad.

Los datos del presente capítulo muestran que los individuos con caries también poseen bacterias con actividad inhibitoria frente a *S. mutans*, (Tablas 1 y 2). La presencia de bacterias antagonistas de los organismos cariogénicos en individuos con caries puede tener las siguientes explicaciones: En primer

lugar los *Streptococcus mutans* no son los únicos agentes causantes de la caries, por lo que la inhibición de este tipo de estreptococos puede no ser condición suficiente para la remisión de la enfermedad. En segundo lugar, es posible que aunque en individuos con caries estén presentes estas cepas inhibidoras del grupo mutans, las mismas se encuentren en una proporción muchísimo menor. En tercer lugar, aunque hemos encontrado estreptococos anti-mutans en individuos con caries, la inhibición efectuada podría deberse a un mecanismo diferente que lo haga menos efectivo en la placa dental. En este sentido, los aislados testados procedentes de individuos con caries mostraron una mayor proporción de cepas productoras de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que las de individuos sanos, lo cual podría condicionar su eficiencia en condiciones de anaerobiosis (Kreth J. y col. 2005). En cualquier caso, la inhibición de estreptococos del grupo mutans no es exclusiva de individuos sin caries.

Para intentar erradicar la caries dental se han utilizado diferentes estrategias, dirigidas bien al diente (mediante agentes remineralizantes o protectores del esmalte, como el flúor) o bien a la microbiota presente en la cavidad oral. Una de ellas ha consistido en luchar contra la caries mediante la búsqueda de genes u operones capaces de expresar sustancias inhibidoras contra organismos cariogénicos, como es el caso de los péptidos antimicrobianos. Por ejemplo, la actividad frente a distintos patógenos orales de algunos péptidos antimicrobianos de origen humano, como las alpha y beta defensinas, o la catelicidina LL37, han sido testado in vitro (Komatsuzawa H. y col. 2007; Kittaka M. y col. 2013), y la búsqueda de nuevos péptidos con actividad antibacteriana puede representar una interesante vía preventiva, pues se ha sugerido que este tipo de sustancias antimicrobianas generan un bajo nivel de resistencias (Dale BA. Y col. 2006). En esta dirección, la clonación de insertos de DNA procedentes de bacterias que habitan en el nicho oral en vectores de expresión puede identificar nuevas sustancias de interés, tal como se ha mostrado en el capítulo 6 de esta tesis. En cualquier caso, dado que las enfermedades orales parecen ser polimicrobianas, el uso de un solo péptido antimicrobiano podría no ser suficiente, y en el futuro, una posible solución podría venir por la elaboración de “cocktails” de péptidos que de forma conjunta muestren actividad específica contra los distintos microorganismos causantes de la enfermedad.

Pero esta no es la única estrategia para luchar contra la caries dental, y otra vía utilizada consiste en el uso de la terapia de reemplazo. Por ejemplo, se ha tratado de reemplazar la cepa salvaje de *S. mutans* en la cavidad oral por una cepa de *S. mutans* menos virulenta, en algunos casos modificada genéticamente. Se sabe que las cepas de *Streptococcus mutans* existentes en personas con caries activas son diferentes a las aisladas a partir de personas libres de caries, y que la diferencia fundamental radica en la producción de una bacteriocina, la mutacina, considerada un factor de virulencia de la caries dental (Hillman JD y col. 1987; Novak J. y col. 1994). En individuos con caries activas se encuentra una mayor

proporción de mutacina I/III mientras que la mutacina IV es más abundante en individuos libres de caries (Kamiya RU. y col. 2005). Sin embargo, los estudios llevados a cabo hasta la fecha son contradictorios sobre los beneficios frente a la caries (Longo PL. y col. 2003; Kamiya y col. 2005). Otros enfoques se han llevado con organismos modificados genéticamente, como es el caso de una cepa recombinante de *S. mutans* que expresa la ureasa, que ha demostrado reducir el cariogenicidad de placa en un modelo animal (Clancy KA. Y col. 2000). Del mismo modo, una cepa recombinante de *Lactobacillus* que expresa anticuerpos dirigidos a una de las adhesinas mayoritarias de *S. mutans* (antígeno I / II) fue capaz de reducir tanto los recuentos de células viables de *S. mutans* como los índices de caries en un modelo de rata (Caglar E. y col. 2005). Estos organismos modificados genéticamente pueden representar opciones de prevención de la enfermedad y de hecho algunas de ellas han sido patentadas. Sin embargo, tienen la desventaja de no ser organismos naturales, pudiendo ser difícil su introducción en el mercado, en primer lugar por las agencias de seguridad alimentaria y posteriormente en lo que se refiere a su aceptación social por la población.

Otro enfoque ha sido el de identificar bacterias probióticas que tengan capacidad de colonizar los dientes e influir de forma beneficiosa en la placa supragingival. Existen algunos probióticos orales que se han testado en ensayos clínicos o preclínicos para ver su eficiencia en disminuir la incidencia de caries o periodontitis, pero están sobre todo centrados en especies de *Lactobacillus*, debido a que estas especies ya son consideradas como seguras por las agencias de seguridad. Sin embargo, la eficiencia de dichas cepas es limitada (Stensson M. y col. 2013), probablemente por la falta de adhesión al diente y por ser estas especies de por sí acidogénicas y haber sido tradicionalmente asociadas a caries (Steinle CJ. Y col. 1967). Otras patentes con este fin incluyen cepas de *Streptococcus rattus*, aislada de un ratón, muy cercana y similar a *S. mutans* pero con menor efecto acidogénico, pudiendo competir con ella por los puntos de unión y nutrientes (Hillman JD. Y col. 2009). Otro ejemplo es el de una cepa de *S. salivarius*, que también ha mostrado efecto inhibitor frente a *S. mutans* (Tagg JR. Y col 1983), si bien éste es menor que el proporcionado por *S. dentisani* (Camelo-Castillo A. y col. 2014). Además, en nuestros análisis de reclutamiento metagenómico, únicamente el 2% de las muestras de placa dental del HMP contenían esta bacteria (*S. salivarius*), probablemente porque se aisló de la mucosa oral, y no es un habitante habitual de las superficies duras, como la placa dental. Este hecho subraya la importancia de que la cepa probiótica deba ser capaz de colonizar y ejercer su función en el tejido donde se genere la enfermedad, que en el caso de la caries es la superficie de los dientes.

Los probióticos en la dieta no deben conferir riesgo alguno para la salud oral, y el papel de las bacterias beneficiosas en la prevención de la aparición de especies patógenas y en la salud oral debe esclarecerse. Por este motivo es necesario mejorar el conocimiento de *Streptococcus dentisani* a fin de

establecer su seguridad en uso alimentario o cosmético y de caracterizar sus mecanismos de adhesión, crecimiento óptimo e inhibición de agentes cariogénicos. En este sentido, se está procediendo a analizar su genoma y encontrar los genes que codifican los agentes inhibidores, que al ser de pequeño tamaño y tener naturaleza peptídica podrían ser bacteriocinas. Idealmente, queremos conocer los genes implicados en la regulación y saber si las moléculas se expresan de forma continua o sólo en contacto con ciertas señales, ya sean moléculas señal, indicadores de pH ácido, u otras bacterias que estimulen su producción. Asimismo, hay que establecer si el potencial probiótico contiene genes de virulencia y/o genes de resistencia a antibióticos que puedan ser transmitidos por elementos móviles. Dado que *Streptococcus dentisani* proporciona un antagonismo directo con *S. mutans*, puede desempeñar un papel biológico importante en la colonización del patógeno, mostrándose como un buen candidato como probiótico administrado en la dieta. Aunque a priori puede resultar difícil que una sola cepa bacteriana pueda modificar un ecosistema establecido formado por decenas o centenas de especies, experimentos *in vitro* en diente artificial han mostrado que la introducción de *S. dentisani* o su sobrenadante en la placa dental reduce entre 3 y 10 veces la cantidad de ácido láctico producido (Cabrera-Rubio y col. sin publicar), apoyando el uso de esta bacteria como probiótico anti-caries.

VI.

Discusión General

La presente tesis muestra **distintas aproximaciones para el estudio del microbioma humano**. Éstas han ido desde la clonación de productos de PCR, pasando por la secuenciación masiva de productos de PCR mediante pirosecuenciación, o la secuenciación directa del ADN ambiental mediante la misma técnica, a la elaboración, cribado y secuenciación de librerías de fósidos y por último el aislamiento de especies presentes en el microbioma mediante sembrado de la muestra. Por lo tanto esta tesis, a nivel metodológico, abarca una amplia gama de las herramientas conocidas hasta la fecha para el estudio del microbioma. Todas estas metodologías son complementarias: mientras que la clonación y secuenciación masiva de productos de PCR es meramente descriptiva respecto a la abundancia relativa de grupos taxonómicos existentes en un microbioma, la secuenciación directa del ADN total nos aporta tanto información cuantitativa como cualitativa, tanto a nivel taxonómico como a nivel funcional de la comunidad microbiana bajo estudio. Todas estas metodologías aportan una ingente cantidad de información, que para ser contrastadas necesitan de las técnicas clásicas de cultivo, como fue el caso de la presente tesis, cuando se aislaron especies previamente detectadas mediante metagenómica en voluntarios sin caries o se estudiaron insertos de éstas mediante librerías de fósidos con una clara función anti-bacteriana. En este trabajo se ha tratado de mostrar la importancia, ventajas y desventajas de cada metodología, concluyendo que todas ellas son complementarias para el estudio de un determinado microbioma. Aunque en nuestro caso nos hemos centrado preferentemente en el estudio de la placa dental, dichas aproximaciones metodológicas pueden ser aplicadas a otros ambientes

humanos, tal como se ha mostrado en esta tesis con la leche materna o las vías aéreas superiores e inferiores (capítulos 3 y 4).

Para describir taxonómicamente la placa dental utilizamos dos metodologías que parten de productos amplificados del gen ribosómico 16S. En cuanto a los **aspectos metodológicos** se concluye que el método de la pirosecuenciación de amplicones mediante códigos de barras permite una secuenciación más barata y rápida, además de un mayor número de secuencias en un menor tiempo para estimar la diversidad biológica de cualquier nicho comparado con la metodología de clonación de productos de PCR. Por este motivo utilizamos la pirosecuenciación mediante códigos de barras en muestras de placa dental, leche materna, esputo, biopsias, aspirado broncoalveolar y lavado broncoalveolar. Respecto a este punto, otro aspecto a tener en cuenta es el uso de cebadores “universales” para amplificar los genes del 16S, pues se conoce que estos cebadores amplifican algunos grupos bacterianos con más facilidad que otros (Sipos R. y col. 2007). Ello puede producir ciertos sesgos a la hora de estimar la biodiversidad (aunque supuestamente estos sesgos afectarían por igual a todas las muestras y por lo tanto las comparaciones entre muestras estarían justificadas). En cuanto a las proporciones detectadas de cada grupo bacteriano, hay que recordar que el número de operones ribosómicos varía entre especies (Acinas S. y col. 2004), de tal manera que los grupos taxonómicos con un alto número de copias ribosómicas podrían estar sobreamplificados. Además, debido a la naturaleza exponencial de la PCR, los grupos que están en mayor proporción se amplifican de forma preferente, mientras que aquellos que están en porcentajes inferiores (especialmente por debajo del 1%) están extremadamente infra-amplificados, exagerando aún más su baja proporción (González J. y col. 2012). Otro aspecto que debemos de tener en cuenta es que la información que aporta esta metodología es enteramente descriptiva de las bacterias que habitan un determinado nicho, siendo una información de interés en un estudio inicial de cualquier ambiente, pero sin aportar ninguna información de carácter funcional de las bacterias presentes, que es lo que en realidad apuntaría el papel que pueden estar jugando.

Por este motivo decidimos pirosecuenciar de forma directa el ADN total, sin amplificar un gen determinado, en una aproximación metagenómica real. El conocimiento del metagenoma de un ambiente en particular puede permitirnos conocer diversos aspectos de la vida microbiana que allí se está generando, como la diversidad (diversidad microbiana, no sólo bacteriana, así como su cuantificación), genes presentes bajo esas condiciones ambientales, o quizás, las diferentes interacciones ecológicas de ese nicho particular, e incluso la búsqueda y caracterización de nuevos organismos

(utilizar información metagenómica para poder cultivar bacterias anteriormente no detectadas). Persiguiendo estos objetivos se ha investigado el metagenoma de la placa dental humana llevado a cabo por Belda-Ferre y colaboradores en 2012, o el estudio de la placa dental en chimpancé descrito en el capítulo 5 de esta tesis. Por medio de la metagenómica también es posible la reconstrucción de genomas completos o casi completos de organismos no cultivables o desconocidos (Venter JC. y col. 2004; Yelton AP. y col. 2013) y la comparación de los mismos, así como la búsqueda de actividades enzimáticas o rutas metabólicas nuevas, o relacionar especies bacterianas con determinadas funciones, o dichas funciones con un hábitat concreto (es decir, genes mayoritariamente presentes en ese nicho) (Rodríguez-Valera F. y col. 2003.). Hay que tener presente que todas estas metodologías están basadas en el ADN, pudiendo obtener secuencias provenientes de organismos que no forman parte de la microbiota activa. Estas especies pueden estar inactivas o muertas, o estar de forma transitoria en el ambiente bajo estudio (por ejemplo ser ingeridas con los alimentos en el caso de la microbiota oral) e inducirían a sobrestimar la diversidad presente, así como a considerar funciones que no forman parte del ecosistema real. Una posible solución a esta sobre-estimación podría pasar por basar nuestros estudios sobre muestras de ARN, para así detectar preferentemente bacterias y funciones que forman parte activa del nicho, y no especies transitorias o contaminantes que no contribuyen al ecosistema.

Otro enfoque metagenómico llevado a cabo en esta tesis ha sido la elaboración de librerías de fósmidos, que además de suministrar la información del metagenoma, proporcionan la oportunidad de la **explotación biotecnológica**, como hemos podido realizar en el capítulo 6 de la presente tesis doctoral. Pero para trabajar con fósmidos debemos tener en cuenta que no son vectores de expresión optimizados, pues tienen un gran tamaño y un bajo número de copias. Por ello, su expresión puede variar de una réplica a otra si las condiciones de inducción a copia múltiple o de crecimiento no son exactamente las mismas. Además, una de las limitaciones de los estudios funcionales con librerías metagenómicas es la dificultad de expresión de genes extraños dentro del vector utilizado (en este caso *E. coli*), probablemente dificultando su expresión, ya que los promotores presentes en el inserto pueden no ser reconocidos por la maquinaria transcripcional o traduccional del hospedador. Por otro lado, la longitud de los insertos (30-45 Kb), si bien permite la clonación de operones completos, dificulta la identificación del gen que codifica la función deseada. Así, para confirmar el gen responsable de entre los candidatos propuestos se tendría que proceder al estudio de los insertos mediante la mutagénesis de los distintos genes para ver cuándo se pierde la actividad, o a la subclonación en vectores de expresión más pequeños para reducir el número de posibles ORFs, acotando la búsqueda cada vez a un inserto de menor tamaño, para caracterizar qué gen o grupo de genes serán los responsables de la función

identificada. Esta aproximación metagenómica puede ser utilizada para todo tipo de sustancias de interés biotecnológico, siempre y cuando se cuente con un sistema de cribado para poder testar a gran escala la actividad deseada, pudiendo suponer que las muestras ambientales son una fuente inagotable de nuevas sustancias bioactivas.

No debemos descartar, las técnicas clásicas de cultivo. Una de las posibles aplicaciones del metagenoma es la identificación de nuevos organismos relevantes para posteriormente utilizar esta información metagenómica para poder cultivar bacterias anteriormente no detectadas o con una función específica, así como relacionar especies con funciones. Este hecho se evidenció en el trabajo de Belda-Ferre y colaboradores en 2012 sobre el metagenoma de la placa dental, donde se detectaron especies a baja o nula frecuencia en individuos con caries, pero con una alta prevalencia en sujetos libres de caries. En la presente tesis se trató de cultivar dichas especies, entre las que se encontraban algunos *Streptococcus*. Varios aislados de dichos *Streptococcus* resultaron tener un efecto antagonista sobre los estreptococos cariogénicos del grupo “Mutans” y trabajo filogenético, fisiológico y genómico han mostrado que algunos de estos aislados corresponden a una nueva especie, el *Streptococcus dentisani sp nov* (Camelo-Castillo y col. 2014) con potencial efecto anti-caries. Por tanto, desde la PCR al cultivo, la presente tesis muestra que sólo una combinación de las distintas aproximaciones metodológicas es capaz de proporcionar la visión completa que se requiere para estudiar el microbioma y para la aplicación de este conocimiento a la hora de combatir las infecciones.

Uno de los aspectos más problemáticos en el estudio del microbioma que esta tesis recalca en sus capítulos 2 y 3 es la selección de una **toma de muestras apropiada**. Como recalcan los trabajos clásicos de química analítica, ningún experimento es mejor que la muestra (Potteiger J. 2011; Tan KH. 2005). En el capítulo 3 de esta tesis, concretamente en el estudio del microbioma de las vías respiratorias, queda de manifiesto lo importante que es tener la muestra apropiada para estudios microbiológicos de las vías aéreas, ya que las muestras de esputo, que se utilizan comúnmente para la identificación de bacterias en infecciones de las vías respiratorias, no son representativas de la composición y proporción de taxones bacterianos en la mucosa bronquial. Por contra, el lavado broncoalveolar mostró una diversidad similar e incluso ligeramente superior a la mucosa, considerándose como un buen sustituto representativo de muestras de tejido bronquial (capítulo 3). Esta falta de correlación entre la muestra y el nicho a estudiar se evidencia en otros ambientes del microbioma humano, como en el tracto gastrointestinal, donde casi todos los ensayos se han realizado con muestras de heces, a pesar de que se ha evidenciado una composición bacteriana muy diferente en

la mucosa intestinal (biopsias) en comparación con las muestras de heces de los mismos individuos (Durbán A. y col. 2011). Otro caso flagrante es la saliva, ampliamente usada en estudios etiológicos y epidemiológicos de enfermedades orales, sin ser representativa de las comunidades microbianas que causan la caries o la periodontitis en los tejidos afectados (Simón-Soro y col. 2013). Por otro lado, una muestra puede estar influenciada por la presencia relativa de la comunidad bacteriana transitoria y por la variabilidad de la microbiota a lo largo del tiempo. A pesar de esta variabilidad, se ha propuesto la existencia de una comunidad microbiana núcleo (Caporaso JG. y col. 2011), pero sin embargo la mayor parte de estudios únicamente toman una sola muestra como representativa. El posible sesgo motivado por estas muestras únicas debe tomarse en consideración en muestras que varían a lo largo del tiempo, ya sea en procesos de desarrollo de un día (ej. formación del biofilm oral tras las comidas, o variación del flujo salivar debido a ritmos circadianos) o a lo largo de semanas o meses, tal como se demuestra en el capítulo 2, donde algunas muestras mostraron una variabilidad mayor entre muestras del mismo individuo que entre distintos individuos. En conclusión, el uso de muestras inadecuadas para el estudio de la diversidad bacteriana del microbioma humano puede tener importantes implicaciones clínicas, pues no utilizar una microbiota representativa del ambiente estudiado puede cuestionar la validez de muchos estudios de metagenómica del microbioma humano y animal.

También hay que subrayar que a pesar del tiempo y esfuerzo que se dedican al estudio del microbioma, aún quedan **nichos por explorar** de los cuales contamos con muy poca información. Uno de estos queda ilustrado por la microbiota de la leche materna, todavía bajo incredulidad de muchos científicos, aunque en modelos animales la evidencia de que esta comunidad microbiana no es una contaminación durante el muestreo es abrumadora (Jeurink PV. y col. 2013). El estudio realizado en esta tesis (capítulo 4), muestra que la leche materna contiene bacterias muy diversas, que son de una composición distinta a la de cualquier otro nicho humano, y que las exposiciones microbianas prenatales y postnatales, podrían tener profundos efectos sobre la colonización microbiana del intestino y la maduración del sistema inmunitario innato, que es necesario entender. Otro ejemplo son las vías respiratorias bajas, consideradas tradicionalmente estériles, donde confirmamos la presencia de una comunidad bacteriana compleja, obteniendo una biodiversidad mayor de lo previsto en pacientes con EPOC sin signos de infección, e incluyéndose microorganismos potencialmente patógenos. Esperamos que este trabajo estimule investigación futura para caracterizar la microbiota del tracto respiratorio en controles sanos para mostrar si las vías bajas son realmente estériles en condiciones de salud, así como explorar la microbiota pulmonar en individuos con diferentes enfermedades respiratorias. Conviene subrayar, en cualquier caso, que estos estudios se han llevado a cabo mediante la amplificación del

ADN, que es una técnica muy sensible capaz de detectar organismos muertos cuyo ADN esté intacto total o parcialmente, debiendo repetir dichos ensayos mediante el RNA para comprobar que la biodiversidad detectada se debe a microorganismos activos (y no a microbiota transitoria inactiva, o muerta).

Una de las finalidades de los estudios de microbioma humano es **mejorar la salud**. Tras el establecimiento hace muchos años de que las bacterias contribuyen a hacer la digestión, sintetizan vitaminas, o detoxifican ciertos compuestos, entre otras funciones (Wilson M. 2005), al poder ahora estudiar las comunidades complejas de forma conjunta, podemos ver también cómo nos ayudan a mantener a raya a ciertos invasores de origen bacteriano o fúngico (Belda-Ferre y col. 2012; Batista GCM. y col. 2014). Así pues, en esta interacción de los organismos entre sí y de éstos con el hospedador, podemos tener la clave para evitar infecciones, siendo una posible vía el uso de probióticos, como los aislados de placa dental de voluntarios sanos descritos en el capítulo 7, pertenecientes al género *Streptococcus*. Al proporcionar un antagonismo directo con el patógeno, estas bacterias pueden desempeñar un papel biológico importante en la colonización, presumiblemente desplazando a *S. mutans* y/o *S. sobrinus*, y mostrándose como un buen candidato como probiótico administrado en la dieta. Otra posibilidad para evitar infecciones podría ser mediante la aplicación de las propias sustancias inhibitoras, como sería el caso de bacteriocinas suministradas en medicamentos (capítulo 6), realizando en esta tesis una aproximación metagenómica para descubrir este tipo de sustancias antibacterianas. Esta metodología puede ser de interés biotecnológico en general, siempre y cuando se cuente con un sistema de cribado para poder testar a gran escala la actividad deseada, siendo no sólo las muestras ambientales naturales sino también las muestras humanas procedentes de individuos sanos un reservorio de sustancias y bacterias que impidan la infección, así como fuente de otro tipo de sustancias activas de interés biomédico.

Finalmente, y después de este trabajo, cabe preguntarse qué trabajo resta por hacer, y más específicamente **¿Qué lagunas existen en el estudio del microbioma?** ¿Hacia dónde deberíamos dirigir nuestros ensayos en este campo? Pienso que el estudio del microbioma humano no se debe limitar a una mera descripción de la diversidad existente en una muestra o a obtener catálogos de especies existentes mediante cultivo de cepas o de insertos de ADN mediante librerías; ha llegado el momento de pasar a una etapa donde se aborde el estudio de aspectos funcionales (por ej. la expresión génica procedente de organismos activos en el nicho a estudio) y el estudio de la interacción con el sistema inmune, aspectos estos en los que todavía tenemos muy poca información. En segundo lugar,

hasta la fecha se estudia casi exclusivamente sólo la fracción bacteriana de un determinado ambiente, pero existen otros componentes que cohabitan junto con el bacteriano y que deberían ser estudiados de forma conjunta, incluyendo por supuesto las arqueas, los hongos o los virus. Ello puede ser fundamental por las más que probables interacciones agonistas y antagonistas entre estos componentes, como podría ser la agregación específica entre hongos y bacterias necesarias para formar biofilms (Metwalli KH. y col. 2013), o el control de las poblaciones bacterianas mediante fagos (Rodríguez-Valera F. y col. 2009). Por tanto, una aproximación metagenómica completa debería pasar por el estudio de todos estos componentes del microbioma, y no de cada uno de ellos de forma aislada. Otro aspecto crucial para entender el microbioma es estudiar su evolución, pues la forma de vida y hábitos del ser humano moderno está provocando la pérdida de diversidad microbiana, y por lo tanto de especies que son necesarias para un determinado nicho y quizás de vital importancia para el equilibrio del ecosistema. Dicha pérdida de diversidad, como la identificada en el capítulo 5 al comparar la microbiota oral humana con la del chimpancé, ha sido detectada a nivel general en la historia reciente del ser humano (Blaser y Falkow, 2009), probablemente como consecuencia de las medidas excesivas de higiene, uso indiscriminado de antibióticos, esterilización excesiva del ambiente cotidiano y de la comida, o incremento de los partos por cesárea, entre otros. Esto probablemente tenga una influencia en la salud, en la capacidad de evitar infecciones, y en la modulación del sistema inmunitario afectando a la incidencia y desarrollo de enfermedades relacionadas con el sistema inmune como las alergias, el asma, las atopias, etc. Es en esta interacción bacteria-hospedador, y en la evolución de la microbiota con el ser humano, donde considero estará la clave para entender su contribución real como un verdadero órgano más del cuerpo, y su papel en salud y enfermedad.

VII.

Conclusiones

En cuanto a las metodologías empleadas, podemos concluir lo siguiente:

1. La pirosecuenciación de productos de PCR del gen ribosómico 16S es un método sencillo, relativamente rápido y económico que proporciona información sobre la composición bacteriana de muestras del microbioma humano y que cuenta con la ventaja de unas extensas bases de datos de referencia. Sin embargo, la taxonomía no proporciona información sobre la funciones llevadas a cabo por los microorganismos.

2. La metagenómica por secuenciación directa sí proporciona esa información funcional y sin sesgos de PCR o clonación, si bien exige un mayor trabajo computacional de análisis así como un mayor coste.

3. Las librerías metagenómicas tienen un enorme sesgo de clonación pero proporcionan la posibilidad de aplicaciones biotecnológicas como la búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana.

4. El cultivo, a pesar de su sesgo, proporciona la oportunidad de estudiar la fisiología de los organismos aislados de forma directa, así como identificar cepas con potencial probiótico.

5. En definitiva, la visión que proporciona esta tesis es la de que las distintas aproximaciones (PCR de genes marcadores filogenéticos, metagenómica directa, librerías metagenómicas y cultivo) son complementarias.

En cuanto a la diversidad bacteriana en los distintos nichos estudiados, podemos concluir que:

1. La composición de la microbiota oral del chimpancé es distinta y más diversa que la del ser humano, sugiriendo que a lo largo de su evolución, el ser humano puede haber perdido parte de su riqueza bacteriana asociada. El perfil funcional codificado por la microbiota de la placa dental del chimpancé es más similar a la de individuos sanos sin caries.

2. El microbioma oral cambia considerablemente a lo largo del tiempo durante un período de cuatro meses, indicando que una sola muestra puede no ser representativa del ecosistema, y que el nicho es más lábil de lo que se suponía.

3. El ecosistema pulmonar no es estéril en individuos con EPOC, y métodos de muestreo clásicos como los esputos no son representativos de la microbiota existente en las vías bajas.

4. La microbiota de la leche materna humana contiene cientos de especies bacterianas, está dominado por bacterias del ácido láctico, y cambia de composición a lo largo del tiempo de lactancia y según el tipo de parto. Se hace necesaria la investigación sobre el papel biológico que dichos organismos pueden tener para la salud humana.

En cuanto a las aplicaciones de la presente tesis en el ámbito de la salud, se puede concluir que:

1. Las librerías metagenómicas proporcionan una vía de identificación de nuevas sustancias con efecto antibacteriano procedentes de micro-organismos presentes en individuos

sanos sin la patología. Cinco regiones bacterianas se han identificado con actividad frente a estreptococos cariogénicos, y como trabajo futuro se deberá caracterizar los compuestos e indicar si su producción a gran escala es rentable para aplicaciones comerciales.

2. Bacterias presentes en la cavidad oral de individuos sin caries han mostrado actividad antibacteriana frente a estreptococos del grupo mutans causantes de caries dental, abriendo la posibilidad de utilizar dichos aislados como probióticos que mejoren la salud bucodental. Uno de estos aislados se ha identificado como una nueva especie, *Streptococcus dentisani* sp. nov, y su aptitud tecnológica y biológica está actualmente siendo testada para su aplicación comercial como probiótico anti-caries.

Bibliografia

1. A. L. Cogen, V. Nizet, and R. L. G. NIH Public Access. *Br J Dermatol.* **158**, 442–455 (2008).
2. Aaltonen, J. *et al.* Impact of maternal diet during pregnancy and breastfeeding on infant metabolic programming: a prospective randomized controlled study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **65**, 10–9 (2011).
3. Aaron, S. D. *et al.* Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 349–55 (2001).
4. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5721–32 (2005).
5. Abiko, Y., Kaizuka, K. & Hosogi, Y. Inhibition of hemolysis by antibody against the *Porphyromonas gingivalis* 130-kDa hemagglutinin domain. *J. Oral Sci.* **43**, 159–163 (2001).
6. Abnet, C. C. *et al.* Tooth loss is associated with increased risk of total death and death from upper gastrointestinal cancer, heart disease, and stroke in a Chinese population-based cohort. *Int. J. Epidemiol.* **34**, 467–74 (2005).
7. Achtman, M. & Wagner, M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Micro* **6**, 431–440 (2008).
8. Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-ceraj, V. & Polz, M. F. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *J. Bacteriol.* **186**, 2629–2635 (2004).
9. Ahn, J. *et al.* Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PLoS One* **6**, e22788 (2011).
10. Alcaraz, L. D. *et al.* Identifying a healthy oral microbiome through metagenomics. *Clin. Microbiol. Infect.* **18 Suppl 4**, 54–7 (2012).
11. Alke Bruns, Heribert Cypionka, and J. & Overmann, “. Cyclic AMP and Acyl Homoserine Lactones Increase the Cultivation Efficiency of Heterotrophic Bacteria from the Central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3978–3987 (2002).
12. ALLAKER, R. P., GREENMAN, J. & OSBORNE, R. H. The production of inflammatory compounds by *Propionibacterium acnes* and other skin organisms. *Br. J. Dermatol.* **117**, 175–183 (1987).
13. Allali, N., Afif, H., Couturier, M. & Melderens, L. Van. The Highly Conserved TldD and TldE Proteins of *Escherichia coli* Are Involved in Microcin B17 Processing and in CcdA Degradation. *J. Bacteriol.* **184**, 3224–3231 (2002).

14. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–10 (1990).
15. Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–69 (1995).
16. Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobsson, H. & Ba, F. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS One* **3**, (2008).
17. Andrew H. Moeller, Patrick H. Degnan, Anne E. Pusey, Michael L. Wilson, B. H. & Hahn, and H. O. Chimpanzees and Humans Harbor Compositionally Similar Gut Enterotypes. *Nature* (2012). doi:10.1038/ncomms2159.Chimpanzees
18. Arkenberg, A., Runkel, S., Richardson, D. J. & Rowley, G. The production and detoxification of a potent cytotoxin, nitric oxide, by pathogenic enteric bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1876–9 (2011).
19. Armougom, F. *et al.* Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 1151–1154
20. Arya, T., Kishor, C., Saddanapu, V., Reddi, R. & Addlagatta, A. Discovery of a new genetic variant of methionine aminopeptidase from Streptococci with possible post-translational modifications: biochemical and structural characterization. *PLoS One* **8**, e75207 (2013).
21. Aziz, R. K. *et al.* The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75 (2008).
22. Badet, M. C., Richard, B. & Dorignac, G. An in vitro study of the pH-lowering potential of salivary lactobacilli associated with dental caries. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 1015–8 (2001).
23. Balows, A. A reassessment of sputum specimens for laboratory diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**, 275–276 (1986).
24. Banin, E., Vasil, M. L. & Greenberg, E. P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11076–81 (2005).
25. Batista, G. C. M. *et al.* Oral colonization: A possible source for candidemia in low-weight neonates. *J. Mycol. Médicale / J. Med. Mycol.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.11.004
26. Bejar, W., Hamden, K., Ben Salah, R. & Chouayekh, H. *Lactobacillus plantarum* TN627 significantly reduces complications of alloxan-induced diabetes in rats. *Anaerobe* **24**, 4–11 (2013).
27. Belda-Ferre, P. *et al.* The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* **6**, 46–56 (2012).

28. Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Moya, A. & Mira, A. Mining Virulence Genes Using Metagenomics. *PLoS One* **6**, e24975 (2011).
29. Benítez-Páez, A. *et al.* Detection of transient bacteraemia following dental extractions by 16S rDNA pyrosequencing: a pilot study. *PLoS One* **8**, e57782 (2013).
30. Bik, E. M. *et al.* Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 732–7 (2006).
31. Bik, E. M. *et al.* Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* **4**, 962–74 (2010).
32. Bisgaard, H. & Szefer, S. Prevalence of asthma-like symptoms in young children. *Pediatr. Pulmonol.* **42**, 723–728 (2007).
33. Bittar, F. *et al.* Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One* **3**, e2908 (2008).
34. Blaser, M. J. & Falkow, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 887–94 (2009).
35. Boško, A. V. *et al.* Vaginal microflora in girls of prepuberal age. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 91–94 (2001). at <<http://europepmc.org/abstract/MED/11548273>>
36. Braga, J., Heuze, Y., Chabadel, O., Sonan, N. K. & Gueramy, A. Non-adult dental age assessment: correspondence analysis and linear regression versus Bayesian predictions. *Int. J. Legal Med.* **119**, 260–274 (2005).
37. Brandtzaeg, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand. J. Immunol.* **70**, 505–15 (2009).
38. Bratthall, D. Mutans streptococci -dental, oral and global aspects. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* **9**, 4–12 (1991).
39. Braun, V. & Hantke, K. Recent insights into iron import by bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 328–334 (2011).
40. Breukink, E. *et al.* The C-Terminal Region of Nisin Is Responsible for the Initial Interaction of Nisin with the Target Membrane†. *Biochemistry* **36**, 6968–6976 (1997).
41. Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M. & Handelsman, J. Census of the Bacterial Community of the Gypsy Moth Larval Midgut by Using Culturing and Culture-Independent Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 293–300 (2004).
42. Brown, E. M., Arrieta, M.-C. & Finlay, B. B. A fresh look at the hygiene hypothesis: How intestinal microbial exposure drives immune effector responses in atopic disease. *Semin. Immunol.* **25**, 378–387 (2013).

43. Burton, J. P. *et al.* Persistence of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 is dose dependent and megaplasmid transfer can augment their bacteriocin production and adhesion characteristics. *PLoS One* **8**, e65991 (2013).
44. Cabello, H. *et al.* Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur. Respir. J.* **10**, 1137–1144 (1997).
45. Çağlar, E., Kargul, B. & Tanboga, I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis.* **11**, 131–137 (2005).
46. Camelo-Castillo, A., Benítez-Páez, A., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R. & Mira, A. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 60–5 (2014).
47. Caporaso, J. G. *et al.* Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol.* **12**, R50 (2011).
48. CARLSSON, P. Distribution of mutans streptococci in populations with different levels of sugar consumption. *Eur. J. Oral Sci.* **97**, 120–125 (1989).
49. Caufield, P. W. & Griffen, A. L. DENTAL CARIES: An Infectious and Transmissible Disease. *Pediatr. Clin. North Am.* **47**, 1001–1019 (2000).
50. Chaba, R. *et al.* Signal integration by DegS and RseB governs the σ^E - mediated envelope stress response in *Escherichia coli*. *PNAS* (2010). doi:10.1073/pnas.1019277108/- /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1019277108
51. Charlson, E. S. *et al.* Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 957–63 (2011).
52. Chaudhuri, N., Dower, S. K., Whyte, M. K. B. & Sabroe, I. Toll-like receptors and chronic lung disease. *Clin. Sci. (Lond)*. **109**, 125–33 (2005).
53. Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X. & Xiang, C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* **7**, e39743 (2012).
54. Chiba, S., Ito, K. & Akiyama, Y. The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. *Mol. Microbiol.* **60**, 448–57 (2006).
55. Chin, C. L. *et al.* *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 85–91 (2005).
56. Chugunov, A. *et al.* Lipid-II forms potential “landing terrain” for lantibiotics in simulated bacterial membrane. *Sci. Rep.* **3**, 1678 (2013).

57. Cohen, D. W. & Goldman, H. M. ORAL DISEASE IN PRIMATES. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **85**, 889–909 (1960).
58. Cole, J. R. *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, D141–5 (2009).
59. Cole, J. R. *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **42**, D633–42 (2014).
60. Coleman, M. L. *et al.* Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science* **311**, 1768–70 (2006).
61. Collado, M. C., D’Auria, G., Mira, A. & Francino, M. P. Human Microbiome and Diseases: A Metagenomic Approach. *Bioact. Food as Diet. Interv. Liver Gastrointest. Dis. Bioact. Foods Chronic Dis. States* 235 (2012).
62. Collado, M. C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J. Clin. Pathol.* **62**, 264–269 (2009).
63. Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K. & Salminen, S. Effect of mother’s weight on infant’s microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* (2010). doi:10.3945/ajcn.2010.29877.Overweight
64. Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K. & Salminen, S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 894–9 (2008).
65. Conway de Macario, E. & Macario, A. J. L. Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 99–108 (2009).
66. Corby, P. M. *et al.* Microbial risk indicators of early childhood caries. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5753–9 (2005).
67. Crielaard, W. *et al.* Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med. Genomics* **4**, 22 (2011).
68. Curran, T. *et al.* Development of a novel DNA microarray to detect bacterial pathogens in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J. Microbiol. Methods* **80**, 257–261 (2010).
69. Curran, T., Coyle, P. V, McManus, T. E., Kidney, J. & Coulter, W. a. Evaluation of real-time PCR for the detection and quantification of bacteria in chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**, 112–8 (2007).
70. Dale, B. a, Tao, R., Kimball, J. R. & Jurevic, R. J. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health* **6 Suppl 1**, S13 (2006).

71. Damerou, K. & St John, a C. Role of Clp protease subunits in degradation of carbon starvation proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 53–63 (1993).
72. Darveau, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 481–490 (2010).
73. Dashper, S. G. *et al.* Characterization of a Novel Outer Membrane Hemin-Binding Protein of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **182**, 6456–6462 (2000).
74. de Jong, A., van Hijum, S. a F. T., Bijlsma, J. J. E., Kok, J. & Kuipers, O. P. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.* **34**, W273–9 (2006).
75. de Lillo, A. *et al.* Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol. Immunol.* **21**, 61–8 (2006).
76. de Soet, J. J. *et al.* Differences in Cariogenicity between Fresh Isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* **25**, 116–122 (1991).
77. Decker, E. *et al.* Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics* **125**, e1433–40 (2010).
78. Delcher, A. L., Phillippy, A., Carlton, J. & Salzberg, S. L. Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2478–83 (2002).
79. Delgado, S., Cabrera-Rubio, R., Mira, A., Suárez, A. & Mayo, B. Microbiological Survey of the Human Gastric Ecosystem Using Culturing and Pyrosequencing Methods. *Microb. Ecol.* **65**, 763–772 (2013).
80. Dent, V. E. & Marsh, P. D. Evidence for a basic plaque microbial community on the tooth surface in animals. *Arch. Oral Biol.* **26**, 171–179 (1981).
81. DeSantis, T. Z. *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5069–72 (2006).
82. Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M. & Relman, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature* **449**, 811–818 (2007).
83. Dewhirst, F. E. *et al.* The canine oral microbiome. *PLoS One* **7**, e36067 (2012).
84. Diamond, G., Legarda, D. & Ryan, L. K. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol. Rev.* **173**, 27–38 (2000).
85. DING Ning, YAN Zhi-min, H. H. Detection or oral fungal flora in patients with primary Sjögren’s syndrome by real-time PCR. *J. Pekin Univ.*
86. Dinsdale, E. A. *et al.* Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* **452**, 629–632 (2008).

87. Dominguez-bello, M. G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS* **107**, 11971–11975 (2010).
88. Donachie, S. P., Foster, J. S. & Brown, M. V. Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME J.* **1**, 97–9 (2007).
89. Donovan, S. M. *et al.* Host-Microbe Interactions in the Neonatal Intestine: Role of Human Milk Oligosaccharides. *Am. Soc. Nutr.* (2012). doi:10.3945/an.112.001859.It
90. Dowd, S. E. *et al.* Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* **8**, 125 (2008).
91. Durbán, A. *et al.* Structural alterations of faecal and mucosa-associated bacterial communities in irritable bowel syndrome. *Environ. Microbiol. Rep.* **4**, 242–247 (2012).
92. Durbán, A. *et al.* Assessing Gut Microbial Diversity from Feces and Rectal Mucosa. *Microb. Ecol.* **61**, 123–133 (2011).
93. Eckburg, P. B., Lepp, P. W. & Relman, D. A. Archaea and Their Potential Role in Human Disease. *Infect. Immun.* **71**, 591–596 (2003).
94. Eduardo J Schiffrin, Dominique Brassart, A/am L Servin, Florence Rochat, and A. D.-H. Immune modulation lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am. J. Clin. Nutr.* (1997).
95. Elizabeth K. Costello, Christian L. Lauber, Micah Hamady, Noah Fierer, J. I. & Gordon, and R. K. NIH Public Access. *Science (80-.)*. **326**, 1694–1697 (2009).
96. Elliott, D. R., Wilson, M., Buckley, C. M. F. & Spratt, D. A. Cultivable Oral Microbiota of Domestic Dogs. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5470–5476 (2005).
97. England, T. N. *Journal Medicine.* **347**, 465–471 (2002).
98. Erb-Downward, J. R. *et al.* Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One* **6**, e16384 (2011).
99. Ermolat’ev, D. S., Babaev, E. V & Van der Eycken, E. V. Efficient One-Pot, Two-Step, Microwave-Assisted Procedure for the Synthesis of Polysubstituted 2-Aminoimidazoles. *Org. Lett.* **8**, 5781–5784 (2006).
100. Erwin G. Zoetendal, Biao Cheng, Satoshi Koike, and R. I. M. Molecular Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract: From Phylogeny to Function. *Curr. Issues Intest. Microbio* (2005).
101. Featherstone, J. D. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev. Dent.* **2 Suppl 1**, 259–264 (2004).

102. Fejerskov, O., Nyvad, B. & Larsen, M. J. Human Experimental Caries Models: Intra-Oral Environmental Variability. *Adv. Dent. Res.* **8**, 134–143 (1994).
103. Fitzgerald, D. B., Fitzgerald, R. J., Adams, B. O. & Morhart, R. E. Prevalence, distribution of serotypes, and cariogenic potential in hamsters of mutans streptococci from elderly individuals. *Infect. Immun.* **41**, 691–7 (1983).
104. Flanagan, J. L. *et al.* Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1954–62 (2007).
105. Fraune, S. & Bosch, T. C. G. Why bacteria matter in animal development and evolution. *BioEssays* **32**, 571–580 (2010).
106. Frias-Lopez, J. & Duran-Pinedo, A. Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J. Bacteriol.* **194**, 2082–95 (2012).
107. Garza, C., Schanler, R. J., Butte, N. F. & Motil, K. J. Special properties of human milk. *Clin. Perinatol.* **14**, 11 (1987).
108. GERALD A. OLSON, ARNOLD S. BLEIWEIS, AND PARKER A. SMALL, J. Adherence Inhibition of *Streptococcus mutans*: an Assay Reflecting a Possible Role of Antibody in Dental Caries Prophylaxis. *Infect. Immun.* **5**, 419–427 (1972).
109. Gerritsen, J. Series: Basic Sciences: Host defence mechanisms of the respiratory system. *Paediatr. Respir. Rev.* **1**, 128–134 (2000).
110. Ghai, R. *et al.* Metagenome of the Mediterranean deep chlorophyll maximum studied by direct and fosmid library 454 pyrosequencing. *ISME J.* **4**, 1154–66 (2010).
111. Ghannoum, M. A. *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* **6**, e1000713 (2010).
112. Gibbons, A. An Evolutionary Theory of Dentistry. *NewFocus*
113. Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L. & Field, K. G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60–63 (1990).
114. Gonzalez, J. M., Portillo, M. C., Belda-Ferre, P. & Mira, A. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS One* **7**, e29973 (2012).
115. Goris, J. *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 81–91 (2007).
116. Gosalbes, M. J. *et al.* Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One* **6**, e17447 (2011).

117. Gotelli, N. J. *et al.* Patterns and causes of species richness: a general simulation model for macroecology. *Ecol. Lett.* **12**, 873–886 (2009).
118. Green, B. T., Lyte, M., Kulkarni-Narla, A. & Brown, D. R. Neuromodulation of enteropathogen internalization in Peyer's patches from porcine jejunum. *J. Neuroimmunol.* **141**, 74–82 (2003).
119. Green, J. C. & Vermillion, J. R. The oral hygiene index: a method for classifying oral hygiene status. *J Am Dent Assoc* **61**, 10 (1960).
120. Grönlund, M.-M. *et al.* Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy* **37**, 1764–1772 (2007).
121. Gross, E. L. *et al.* Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 4121–8 (2010).
122. Gross, R., Hacker, J. & Goebel, W. The Leopoldina international symposium on parasitism, commensalism and symbiosis--common themes, different outcome. *Mol. Microbiol.* **47**, 1749–58 (2003).
123. Guarner, F. *et al.* Mechanisms of Disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pr. Gastroenterol Hepatol* **3**, 275–284 (2006).
124. Guder, A., Wiedemann, I. & Sahl, H.-G. Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Pept. Sci.* **55**, 62–73 (2000).
125. Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S. & Isolauri, E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* **92**, 64–66 (2007).
126. Guss, A. M. *et al.* Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *ISME J.* **5**, 20–9 (2011).
127. Haley, B. J. *et al.* Comparative genomic analysis reveals evidence of two novel *Vibrio* species closely related to *V. cholerae*. *BMC Microbiol.* **10**, 154 (2010).
128. Hall, B. Uniformity of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 304–312 (1979).
129. Hamilton, I. R. Ecological basis for dental caries. *Oral Bact. Ecol. Horiz. Sci. Press. Wymondham, Engl.* 219–275 (2000).
130. Hammami, R., Zouhir, A., Ben Hamida, J. & Fliss, I. BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol.* **7**, 89 (2007).
131. Harlan, J. M., Schwartz, B. R., Harker, L. A. & Clinic, S. Glutathione Redox Cycle Protects Cultured Endothelial Cells against Lysis by Extracellularly Generated Hydrogen Peroxide. *Scripps Clin. Res. Found.* 706–713 (1984).

132. Harris, J. O., Swenson, E. W. & Johnson, J. E. Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J. Clin. Invest.* **49**, 2086–96 (1970).
133. Harvey, C. E., Thornsberry, C., Miller, B. R. & Shofer, F. S. Antimicrobial susceptibility of subgingival bacterial flora in cats with gingivitis. *J. Vet. Dent.* **12**, 157–160 (1995).
134. Hasslöf, P., Hedberg, M., Twetman, S. & Stecksén-Blicks, C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli—an in vitro study. *BMC Oral Health* **10**, 18 (2010).
135. Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M. & Benno, Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1093–101 (2005).
136. Hendricks, K. M. & Badruddin, S. H. Weaning Recommendations: The Scientific Basis. *Nutr. Rev.* **50**, 125–133 (1992).
137. Hill, A. T., Campbell, E. J., Hill, S. L., Bayley, D. L. & Stockley, R. A. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am. J. Med.* **109**, 288–295 (2000).
138. Hillman, J. D. *et al.* Construction and Characterization of an Effector Strain of Streptococcus mutans for Replacement Therapy of Dental Caries. *INFECTIOUS Immun.* **68**, 543–549 (2000).
139. Hillman, J. D., Dzuback, A. L. & Andrews, S. W. Colonization of the Human Oral Cavity by a Streptococcus mutans Mutant Producing Increased Bacteriocin. *J. Dent. Res.* **66**, 1092–1094 (1987).
140. Hillman, J. D., McDonnell, E., Cramm, T., Hillman, C. H. & Zahradnik, R. T. A spontaneous lactate dehydrogenase deficient mutant of Streptococcus mutans for use as a probiotic in the prevention of dental caries. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1551–8 (2009).
141. Hilty, M. *et al.* Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* **5**, e8578 (2010).
142. Hinderhofer, M. *et al.* Evolution of prokaryotic SPFH proteins. *BMC Evol. Biol.* **9**, 10 (2009).
143. Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T. & Maeda, N. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J. Dent. Res.* **88**, 982–990 (2009).
144. Holland, S. M. Analytic Rarefaction 1.3. *Univ. Georg. Athens* (2003).
145. Hoppu, U., Isolauri, E., Laakso, P., Matomäki, J. & Laitinen, K. Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines. *Eur. J. Nutr.* **51**, 211–219 (2012).

146. Huber, T., Faulkner, G. & Hugenholtz, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**, 2317–9 (2004).
147. Hunt, K. M. *et al.* Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* **6**, e21313 (2011).
148. Hutter, G. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology* **149**, 67–75 (2003).
149. Huurre, A. *et al.* Mode of Delivery – Effects on Gut Microbiota and Humoral Immunity. *Neonatology* **93**, 236–240 (2008).
150. Hyink, O., Balakrishnan, M. & Tagg, J. R. Streptococcus rattus strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**, 235–41 (2005).
151. III, J. E. C. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 840–862 (2004).
152. Indigestible, S., Affect, O., Bowel, L. & Acids, F. S. F. Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats. *J. Nutr.* 130–136 (1997).
153. J Gregory Caporaso, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D Bushman, Elizabeth K Costello, Noah Fierer, Antonio Gonzalez Peña, Julia K Goodrich, Jeffrey I Gordon, Gavin A Huttenhower, Scott T Kelley, Dan Knights, Jeremy E Koenig, Ruth E , and R. K. NIH Public Access. *Nat. Methods* **7**, 335–336 (2010).
154. J. D. HILLMAN, J. N., SAGURA, E., JUAN A. GUTIERREZ, T. A. BROOKS, P. J. C. & M. HESS, ABDUL AZIZI, K.-P. LEUNG, DENNIS CVITKOVITCH, A. A. S. B. Genetic and Biochemical Analysis of Mutacin 1140, a Lantibiotic from Streptococcus mutans. *Infect. Immun.* **66**, 2743–2749 (1998).
155. Jaczewska, S., Bielicki, D. & Safranow, K. PREVALENCE OF CRYPTOSPORIDIUM SP. IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER. *Pol. PRZEGLAD Chir. Chir.* 348–351 (2012).
156. James, F. C. & Rathbun, S. Rarefaction, relative abundance, and diversity of avian communities. *Auk* 785–800 (1981).
157. Jenkinson, H. F. & Lamont, R. J. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* **13**, 589–595 (2005).
158. Jeurink, P. V *et al.* Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef. Microbes* **4**, 17–30 (2013).
159. Jones, B. V, Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. M. & Marchesi, J. R. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13580–5 (2008).

160. Jones, P. G. & Inouye, M. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.* **21**, 1207–1218 (1996).
161. Junjie Qin, Ruiqiang Li¹, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, Nicolas Pons, Florence Levenez, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Junhua Li, Junming Xu, Shaochuan Li, Dongfang Li, Jianjun Cao, S. & Dusko Ehrlich⁶, and J. W. Europe PMC Funders Group. *Eur. PMC Funders Gr. Author Manuscr.* **464**, 59–65 (2010).
162. Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S. S. Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Sci.* **296**, 1127–1129 (2002).
163. Kalliomäki, M., Collado, M. C., Salminen, S. & Isolauri, E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 534–8 (2008).
164. Kamiya, R. U., Napimoga, M. H., Höfling, J. F. & Gonçalves, R. B. Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. *J. Med. Microbiol.* **54**, 599–604 (2005).
165. KAREN F. ROSS, CLIVE W. RONSON, A. J. R. T. Isolation and Characterization of the Lantibiotic Salivaricin A and Its Structural Gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2014–2021 (2014).
166. Kasper, S. & Schuler, M. Targeted therapies in gastroesophageal cancer. *Eur. J. Cancer* (2014). doi:10.1016/j.ejca.2014.01.009
167. Keijser, B. J. F. *et al.* Pyrosequencing analysis of the Oral Microflora of healthy adults. *J. Dent. Res.* **87**, 1016–1020 (2008).
168. Kilgore, L. Dental pathologies in ten free-ranging chimpanzees from Gombe National Park, Tanzania. *Am. J. Phys. Anthropol.* **80**, 219–227 (1989).
169. Kim, J. N., Stanhope, M. J. & Burne, R. a. Core-gene-encoded peptide regulating virulence-associated traits in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **195**, 2912–20 (2013).
170. KING, L. S. Dr. Koch’s Postulates. *J. Hist. Med. Allied Sci.* **VII**, 350–361 (1952).
171. Kittaka, M. *et al.* Antimicrobial peptide LL37 promotes vascular endothelial growth factor-A expression in human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* **48**, 228–234 (2013).
172. Klaasen, H. L. *et al.* Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. *Infect. Immun.* **61**, 303–6 (1993).
173. Kleinberg, I. a Mixed-Bacteria Ecological Approach To Understanding the Role of the Oral Bacteria in Dental Caries Causation: an Alternative To *Streptococcus Mutans* and the Specific-Plaque Hypothesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13**, 108–125 (2002).

174. Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G. & Foster, J. S. Communication among Oral Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol.* **66**, 486–505 (2002).
175. Komatsuzawa, H. *et al.* Susceptibility of Periodontopathogenic and Cariogenic Bacteria to Defensins and Potential Therapeutic Use of Defensins in Oral Diseases. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 3084–3095
176. Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2567–72 (2005).
177. Korber, P., Stahl, J. M., Nierhaus, K. H. & Bardwell, J. C. Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *EMBO J.* **19**, 741–8 (2000).
178. Kramer, N., Hahn, J. & Dubnau, D. Multiple interactions among the competence proteins of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **65**, 454–64 (2007).
179. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. & Qi, F. Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofil. *J. Bacteriol.* **187**, 7193–7203 (2005).
180. Kuramitsu, H. K. Molecular Genetic Analysis of the Virulence of Oral Bacterial Pathogens: an Historical Perspective. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **14**, 331–344 (2003).
181. Kuroda, M. *et al.* Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1225–1240 (2001).
182. Kurtz, S. *et al.* Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* **5**, R12 (2004).
183. Laitinen, K., Poussa, T. & Isolauri, E. Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* **101**, 1679–87 (2009).
184. Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. & Mira, A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* 544–551 (2012). doi:10.3945/ajcn.112.037382.INTRODUCTION
185. Larsen, N. *et al.* Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* **5**, e9085 (2010).
186. Lazarevic, V., Whiteson, K., Hernandez, D., François, P. & Schrenzel, J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics* **11**, 523 (2010).
187. Le Huërrou-Luron, I., Blat, S. & Boudry, G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 23–36 (2010).

188. LeBouder, E. *et al.* Modulation of neonatal microbial recognition: TLR-mediated innate immune responses are specifically and differentially modulated by human milk. *J. Immunol.* **176**, 3742–52 (2006).
189. Leclerc, M. *et al.* Session 7: Prebiotics and probiotics usefulness against pathologies Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc. Nutr. Soc.* 407–415 (2010). doi:10.1017/S0029665110001898
190. Lee, D.-G. *et al.* Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. *Biotechnol. Lett.* **29**, 465–472 (2007).
191. Lenz, D. H. *et al.* The Small RNA Chaperone Hfq and Multiple Small RNAs Control Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell Press* **118**, 69–82 (2004).
192. Li, W. & Godzik, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**, 1658–9 (2006).
193. Listgarten, M. A. & Lai, C.-H. Comparative Microbiological Characteristics of Failing Implants and Periodontally Diseased Teeth. *J. Periodontol.* **70**, 431–437 (1999).
194. Liu, Z., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L. & Knight, R. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* **36**, e120 (2008).
195. Lodish, H. *Biología celular y molecular*. (Ed. Médica Panamericana, 2005).
196. Loesche, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* **50**, 353–80 (1986).
197. Longo, P. L., Mattos-Graner, R. O. & Mayer, M. P. A. Determination of mutacin activity and detection of *mutA* genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**, 144–149 (2003).
198. Lönnerdal, B. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* (1985).
199. Lorenz, P. & Eck, J. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Micro* **3**, 510–516 (2005).
200. Lozupone, C., Hamady, M. & Knight, R. UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* **7**, 371 (2006).
201. Ludwig, W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 225–236 (2007).
202. Mackie, R. I., Sghir, a & Gaskins, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 1035S–1045S (1999).

203. Macpherson, A. J. & Uhr, T. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Sci.* **303**, 1662–1665 (2004).
204. Madupu, R., Szpakowski, S. & Nelson, K. E. Microbiome in human health and disease. *Sci. Prog.* **96**, (2013).
205. Manimozhiyan Arumugam, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Gabriel R. Fernandes, Julien Tap, Thomas Bruls, Jean-Michel Batto, Marcelo Bertalan, Natalia Borruel, Francesc Casellas, Leyden Fernandez, Laurent Gautie, and P. B. Europe PMC Funders Group. *Eur. PMC Funders Gr. Author* **473**, 174–180 (2011).
206. Marcelo Henrique Napimoga, Jose Francisco Höfling, Marlise Inez Klein, R. U. K. and R. B. G. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J. Oral Sci.* **47**, 59–64 (2005).
207. Marcus J. Claesson* and Paul W. O’Toole. Evaluating the latest high-throughput molecular techniques for the exploration of microbial gut communities. *Gut Microbes* 277–278 (2010). doi:10.1371/jour-nal.pone.0006669.he
208. Marin, a *et al.* Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **35**, 295–302 (2010).
209. Marin, A. *et al.* Effect of Bronchial Colonisation on Airway and Systemic Inflammation in Stable COPD. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* **9**, 121–130 (2012).
210. Marsh, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent. Clin. North Am.* **43**, 599–614, v–vi (1999).
211. Marsh, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* **6 Suppl 1**, S14 (2006).
212. Marsh, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent. Clin. North Am.* **54**, 441–54 (2010).
213. Martín, R. *et al.* Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res. Microbiol.* **158**, 31–37 (2007).
214. Martín, R. *et al.* Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 965–9 (2009).
215. Massé, E. & Arguin, M. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 462–468 (2005).
216. Massé, E. & Gottesman, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 4620–5 (2002).

217. Mavrodi, D. V, Loper, J. E., Paulsen, I. T. & Thomashow, L. S. Mobile genetic elements in the genome of the beneficial rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *BMC Microbiol.* **9**, 8 (2009).
218. McKenna, P. *et al.* The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathog.* **4**, e20 (2008).
219. Medini, D. *et al.* Microbiology in the post-genomic era. *Nat Rev Micro* **6**, 419–430 (2008).
220. Merlin, C., Mcateer, S. & Coulson, A. Why Is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* **185**, 6415–6424 (2003).
221. Metwalli, K. H., Khan, S. a, Krom, B. P. & Jabra-Rizk, M. A. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog.* **9**, e1003616 (2013).
222. Metzker, M. L. Sequencing technologies [mdash] the next generation. *Nat Rev Genet* **11**, 31–46 (2010).
223. Meyer, F. *et al.* The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* **9**, 386 (2008).
224. Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F. & Grayson, M. L. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 475–479 (1995).
225. Mira, A. & Ochman, H. Gene location and bacterial sequence divergence. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 1350–8 (2002).
226. Miravittles, M., Espinosa, C., Ferna, E. & Gallego, M. Relationship Between Bacterial Flora in Sputum and Functional Impairment in Patients With Acute Exacerbations of COPD*. *Clin. Investig.*
227. Monsó, E. *et al.* Bacterial infection in exacerbated COPD with changes in sputum characteristics. *Epidemiol. Infect.* **131**, 799–804 (2003).
228. Monsó, E. *et al.* Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* **13**, 338–42 (1999).
229. Monsó, E. *et al.* Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 1316–1320 (1995).
230. Müller, M. P., Albers, M. F., Itzen, A. & Hedberg, C. Exploring adenylation and phosphocholination as post-translational modifications. *Chembiochem* **15**, 19–26 (2014).

231. Murphy, T. F., Brauer, A. L., Schiffmacher, A. T. & Sethi, S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**, 266–72 (2004).
232. Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 317–322 (1999).
233. NA Rodriguez, PP Meier, Groer MW, and J. Z. NIH Public Access. *J Perinatol.* **29**, 1–7 (2009).
234. Novák, J., Caufield, P. W. & Miller, E. J. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **176**, 4316–20 (1994).
235. Oftedal, O. The Mammary Gland and Its Origin During Synapsid Evolution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**, 225–252 (2002).
236. Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. & Stahl, D. A. Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**, 337–365 (1986).
237. Ozaki, K. *et al.* A Quantitative Comparison of Selected Bacteria in Human Carious Dentine by Microscopic Counts. *Caries Res.* **28**, 137–145 (1994).
238. Pace, N. R. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science (80-)*. **276**, 734–740 (1997).
239. Packer, L. & Cadenas, E. Lipoic acid: energy metabolism and redox 10.3164/jcbn.11-005FR ReviewjKyoto, Japanthe Society for Free Radical Research Japan Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition JCBN 1880 00090912 5086cbn1-1-005FR regulation of transcription and cell signaling. *Pharmacol. Pharm. Sci.* **48**, 26–32 (2010).
240. Pao, S. S., Paulsen, I. A. N. T., Saier, M. H., Inclusion, P. & The, O. F. Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1–34 (1998).
241. Paster, B. J. *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* **183**, 3770–3783 (2001).
242. Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A. & Dewhirst, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol. 2000* **42**, 80–87 (2006).
243. Patel, I. S. *et al.* Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* **57**, 759–64 (2002).
244. Pearson, S., Bowen, W. H. & Burne, R. A. Characterization of Recombinant, Ureolytic *Streptococcus mutans* Demonstrates an Inverse Relationship between Dental Plaque Ureolytic Capacity and Cariogenicity. *Infect. Immun.* **68**, 2621–2629 (2000).

245. Pei, A. Y. *et al.* Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3886–97 (2010).
246. Perez, P. F. *et al.* Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* **119**, e724–32 (2007).
247. Peter J. Turnbaugh, Ruth E. Ley, Micah Hamady, Claire Fraser-Liggett, R. K. & Gordon, and J. I. NIH Public Access. *Nature* **449**, 804–810 (2007).
248. Peter J. Turnbaugh, Vanessa K. Ridaura, Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey¹, R. & Knight, and J. I. G. NIH Public Access. *Sci Transl Med.* **1**, 1–19 (2009).
249. Petersen, P.-E. Policy for Prevention of Oral Manifestations in HIV/AIDS: The Approach of the WHO Global Oral Health Program. *Adv. Dent. Res.* **19** , 17–20 (2006).
250. Petherick, A. Development: Mother's milk: A rich opportunity. *Nature* **468**, S5–S7 (2010).
251. Philpott, D. J. & Girardin, S. E. Gut microbes extend reach to systemic innate immunity. *Nat Med* **16**, 160–161 (2010).
252. Pin, I., Gibson, P. G., Hargreave, F. E. & Dolovich, J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 25–29 (1992).
253. Pineiro, M. & Stanton, C. Probiotic bacteria: legislative framework-- requirements to evidence basis. *J. Nutr.* **137**, 850S–3S (2007).
254. Pivetti, C. D. *et al.* Two Families of Mechanosensitive Channel Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 66–85 (2003).
255. Pizzichini, E. *et al.* Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 308–317 (1996).
256. Poethke, R. *et al.* A putative enzyme from various secretions specifically inhibits antibody-antigen interactions. *J. Immunol. Methods* **191**, 149–157 (1996).
257. Polyakov, N. E., Leshina, T. V, Salakhutdinov, N. F., Konovalova, T. A. & Kispert, L. D. Antioxidant and redox properties of supramolecular complexes of carotenoids with β -glycyrrhizic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1804–1809 (2006).
258. Poole, R. K. & Hughes, M. N. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* **36**, 775–83 (2000).
259. Potteiger, J. GOOD Oil Analysis Starts With GOOD Sampling Practices. *uptime* 47
260. Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S. & Cantor, A. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 981214 (2011).

261. Prentice, A. M. *et al.* Energy requirements of pregnant and lactating women. *Eur. J. Clin. Nutr.* **50**, S82 (1996).
262. Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**, e9490 (2010).
263. Pruesse, E. *et al.* SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7188–96 (2007).
264. Quince, C. *et al.* Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Meth* **6**, 639–641 (2009).
265. Qutaishat, S. S. *et al.* Transmission of Salmonella enterica Serotype Typhimurium DT104 to Infants Through Mother's Breast Milk. *Pediatr.* **111**, 1442–1446 (2003).
266. Räihä, N. C. R. Nutritional Proteins in Milk and the Protein Requirement of Normal Infants. *Pediatr.* **75**, 136–141 (1985).
267. Ravel, J. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. *PNAS* (2010). doi:10.1073/pnas.1002611107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002611107
268. Reed, a. Preparation of the patient for awake flexible fiberoptic bronchoscopy. *Chest* **101**, 244–253 (1992).
269. Reid, G. Probiotic and Prebiotic Applications for Vaginal Health. *J. AOAC Int.* **95**, 31–34
270. Rescigno, M. *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361–367 (2001).
271. Richter, M. & Rosselló-Móra, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19126–31 (2009).
272. Robert A Edwards, Beltran Rodriguez-Brito, LindaWegley, Matthew Haynes, Mya Breitbart, DeanMPeterson, Martin O Saar, Scott Alexander, E. C. A. J. and F. R. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics* **13**, 1–13 (2006).
273. Robert K. Colwell, Carsten Rahbek & Nicholas J. Gotelli. The Mid-Domain Effect and Species Richness Patterns: What Have We Learned So Far? *Am. Nat.* **163**, E1–E23 (2004).
274. Roca, J. *et al.* Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **22**, 217–224 (1986).
275. RodrÄ±guez-Valera, F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 153–158 (2004).

276. Rodríguez-Valera, F. *et al.* Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 828–36 (2009).
277. Roger, L. C. & McCartney, A. L. Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiology* **156**, 3317–28 (2010).
278. Rogers, A. V., Ädelroth, E., Hattotuwa, K., Dewar, A. & Jeffery, P. K. Bronchial mucosal dendritic cells in smokers and ex-smokers with COPD: an electron microscopic study. *Thorax* **63**, 108–114 (2008).
279. Rogers, G. B., Carroll, M. P. & Bruce, K. D. Studying bacterial infections through culture-independent approaches. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1401–1418 (2009).
280. Roh, E. *et al.* Characterization of a new bacteriocin, Carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7541–9 (2010).
281. Romby, P., Vandenesch, F. & Wagner, E. G. H. The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 229–236 (2006).
282. Rosell, A. *et al.* Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Intern. Med.* **165**, 891–7 (2005).
283. Ross, M. A. Could oxidative stress be a factor in neurodevelopmental disorders? *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* **63**, 61–63 (2000).
284. Rudney, J. D. Saliva and Dental Plaque. *Adv. Dent. Res.* **14**, 29–39 (2000).
285. RUDOLF I. AMANN, L. K. A. D. A. S. Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. *J. Bacteriol.* **172**, 762–770 (1990).
286. Ruth E. Ley, Micah Hamady, Catherine Lozupone, Peter Turnbaugh, Rob Roy Ramey, J. Stephen Bircher, Michael L. Schlegel, Tammy A. Tucker, Mark D. Schrenzel, Rob Knight, and J. I. G. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science (80-)*. **320**, 1647–1651 (2009).
287. Sala-Vila, A., Castellote, A. I., Rodríguez-Palmero, M., Campoy, C. & López-Sabater, M. C. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation. *Nutrition* **21**, 467–473 (2005).
288. Savage, D. C. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 107–133 (1977).
289. Schloss, P. D. & Handelsman, J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 303–310 (2003).

290. Schloss, P. D. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–41 (2009).
291. Schmeisser, C., Steele, H. & Streit, W. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 955–962 (2007).
292. Schoolnik, G. K. Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 20–26 (2002).
293. Segata, N. *et al.* Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* **13**, R42 (2012).
294. Selvin, J., Kennedy, J., Lejon, D. P. H., Kiran, G. S. & Dobson, A. D. W. Isolation identification and biochemical characterization of a novel halo-tolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*. *Microb. Cell Fact.* **11**, 72 (2012).
295. Sethi, S., Maloney, J., Grove, L., Wrona, C. & Berenson, C. S. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 991–8 (2006).
296. Sethi, S. *et al.* Airway bacterial concentrations and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 356–61 (2007).
297. Sharma, A. *et al.* Expression of Functional *Porphyromonas gingivalis* Fimbrillin Polypeptide Domains on the Surface of *Streptococcus gordonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3933–3938 (1996).
298. Simmonds, R. S., Tompkins, G. R. & George, R. J. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. *N. Z. Dent. J.* **96**, 44 (2000).
299. Simón-Soro, a, Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Alcaraz, L. D. & Mira, a. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res.* **47**, 591–600 (2013).
300. Simón-Soro, Á. *et al.* Microbial Geography of the Oral Cavity. *J. Dent. Res.* **92**, 616–621 (2013).
301. Singh, B. K. & Macdonald, C. A. Drug discovery from uncultivable microorganisms. *Drug Discov. Today* **15**, 792–799 (2010).
302. Singh, J. *et al.* Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnol. J.* **4**, 480–94 (2009).
303. Sinnott, C. H. B. J. M. & Alabama, U. of S. THE PERCEPTION OF COMPLEX ACOUSTIC PATTERNS IN NOISE BY BLUE MONKEY (*CERCOPITHECUS MITIS*) AND HUMAN LISTENERS. *Int. J. Comp. Psychol.* (1990).

304. Sipos, R. *et al.* Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**, 341–50 (2007).
305. Siqueira, J. F. & Rôças, I. N. As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases. *J. Oral Microbiol.* **5**, 1–14 (2013).
306. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**, 134–44 (1998).
307. Socransky, S. S. & Manganiello, S. D. The Oral Microbiota of Man From Birth to Senility. *J. Periodontol.* **42**, 485–496 (1971).
308. Sogin, M. L. *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12115–20 (2006).
309. Sogin, S. J., Sogin, M. L. & Woese, C. R. Phylogenetic measurement in prokaryotes by primary structural characterization. *J. Mol. Evol.* **1**, 173–184 (1972).
310. Soler, N. *et al.* Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **14**, 1015–22 (1999).
311. Soler, N. *et al.* Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 1498–505 (1998).
312. Song, Q., Adler, G. & Bode, G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J. Med. Microbiol.* **49**, 349–353 (2000).
313. Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-domenigg, T. & Greenberg, E. P. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **59**, 1542–1558 (2006).
314. Sorek, R. *et al.* Genome-Wide Experimental Determination of Barriers to Horizontal Gene Transfer. *Sci.* **318**, 1449–1452 (2007).
315. Stackebrandt, E. & Woese, C. R. The phylogeny of prokaryotes. *Microbiol. Sci.* **1**, 117–122 (1984).
316. Staden, R., Beal, K. & Bonfield, J. in *Bioinforma. Methods Protoc. SE - 7* (Misener, S. & Krawetz, S.) **132**, 115–130 (Humana Press, 1999).
317. STAHL, D. A., LANE, D. J., OLSEN, G. J. & PACE, N. R. Analysis of Hydrothermal Vent-Associated Symbionts by Ribosomal RNA Sequences. *Sci.* **224**, 409–411 (1984).

318. Staley, J. T. & Konopka, A. Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 321–346 (1985).
319. Stecher, B. & Hardt, W.-D. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.* **16**, 107–114 (2008).
320. Steele-Mortimer, O. & Subtil, A. Editorial overview: Host–microbe interactions: bacteria: War and peace: the fragile equilibrium between bacteria and host. *Curr. Opin. Microbiol.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.01.001
321. Steinle, C. J., Madonia, J. V & Bahn, A. N. Relationship of Lactobacilli to the Carious Lesion. *J. Dent. Res.* **46**, 191–196 (1967).
322. Stensson, M. *et al.* Oral Administration of *Lactobacillus reuteri* during the First Year of Life Reduces Caries Prevalence in the Primary Dentition at 9 Years of Age. *Caries Res.* **48**, 111–117 (2014).
323. Stepper, J. *et al.* Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett.* **585**, 645–50 (2011).
324. Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M. & Breznak, J. A. New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4748–4755 (2004).
325. Stingl, K. *et al.* Channel-mediated potassium uptake in *Helicobacter pylori* is essential for gastric colonization. *EMBO J.* **26**, 232–41 (2007).
326. Stockinger, S., Hornef, M. & Chassin, C. Establishment of intestinal homeostasis during the neonatal period. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3699–3712 (2011).
327. Stolzenberg-solomon, R. Z. *et al.* Tooth loss, pancreatic cancer, and *Helicobacter pylori*. *Am. J. Clin. Nutr.* 176–181 (2003).
328. Streit, W. R. & Schmitz, R. A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 492–498 (2004).
329. Sturgeon, A., Stull, J. W., Costa, M. C. & Weese, J. S. Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet. Microbiol.* **162**, 891–898 (2013).
330. Sturman, J. A., Rassin, D. K. & Gaull, G. E. TAURINE IN DEVELOPING RAT BRAIN: MATERNAL-FETAL TRANSFER OF [35S]TAURINE AND ITS FATE IN THE NEONATE. *J. Neurochem.* **28**, 31–39 (1977).
331. Suau, a *et al.* Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4799–4807 (1999).

332. Tagg, J. R., Pybus, V., Phillips, L. V & Fiddes, T. M. Application of inhibitor typing in a study of the transmission and retention in the human mouth of the bacterium *Streptococcus salivarius*. *Arch. Oral Biol.* **28**, 911–915 (1983).
333. Tagg, J. R. & Dierksen, K. P. Bacterial replacement therapy: adapting “germ warfare” to infection prevention. *Trends Biotechnol.* **21**, 217–223 (2003).
334. Takahashi, K. Influence of bacteria on epigenetic gene control. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 1045–54 (2014).
335. Takahashi, N. & Nyvad, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res.* **42**, 409–418 (2008).
336. Tan, K. H. *Soil sampling, preparation, and analysis*. (CRC press, 2005).
337. Tang, Y. P., Dallas, M. M. & Malamy, M. H. Characterization of the BatI (*Bacteroides aerotolerance*) operon in *Bacteroides fragilis*: isolation of a *B. fragilis* mutant with reduced aerotolerance and impaired growth in in vivo model systems. *Mol. Microbiol.* **32**, 139–149 (1999).
338. Tanzer, J. M., Livingston, J. & Thompson, a M. The microbiology of primary dental caries in humans. *J. Dent. Educ.* **65**, 1028–37 (2001).
339. Tanzer, J. M. *et al.* Caries Inhibition by and Safety of *Lactobacillus paracasei* DSMZ16671. *J. Dent. Res.* **89**, 921–926 (2010).
340. Taylor, C. Linking research with clinical practice. *Nurs. N. Z.* **7**, 24–5 (2001).
341. ten Cate, J. M. & van Loveren, C. Saliva, caries and diagnostics. *Ned. Tijdschr. Tandheelkd.* **99**, 85–88 (1992).
342. Thabuis, C. *et al.* Effects of maltitol and xylitol chewing-gums on parameters involved in dental caries development. *Eur. J. Paediatr. Dent.* **14**, 303–308 (2013).
343. Thavagnanam, S., Fleming, J., Bromley, A., Shields, M. D. & Cardwell, C. R. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 629–633 (2008).
344. Thorpe, J. E., Baughman, R. P., Frame, P. T., Wesseler, T. A. & Staneck, J. L. Bronchoalveolar Lavage for Diagnosing Acute Bacterial Pneumonia. *J. Infect. Dis.* **155**, 855–861 (1987).
345. Timothy F. Murphy, Aimee L. Brauer, Sanjay Sethi, Mogens Kilian, Xueya Cai, and A. J. L. *Haemophilus haemolyticus*: A Human Respiratory Tract Commensal to Be Distinguished from *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Dis.* **14215**, (2007).
346. Toledo-Arana, A., Repoila, F. & Cossart, P. Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 182–188 (2007).

347. Twetman, S. Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy? *Braz. Oral Res.* **26 Suppl 1**, 64–70 (2012).
348. Van Scoy, R. E. Bacterial sputum cultures. A clinician's viewpoint. *Mayo Clin. Proc.* **52**, 39–41 (1977).
349. Venter, J. C. *et al.* Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Sci.* **304**, 66–74 (2004).
350. Vercelli, D. Mechanisms of the hygiene hypothesis — molecular and otherwise. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 733–737 (2006).
351. Walker, A. Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. *J. Pediatr.* **156**, S3–S7 (2010).
352. Wall, R. *et al.* Role of gut microbiota in early infant development. *Clin. Med. Pediatr.* **3**, 45–54 (2009).
353. Walther, B., Karl, J. P., Booth, S. L. & Boyaval, P. Menaquinones, Bacteria, and the Food Supply: The Relevance of Dairy and Fermented Food Products to Vitamin K Requirements. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* **4**, 463–473 (2013).
354. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5261–7 (2007).
355. Warnes, G. R. *et al.* gdata: Various R programming tools for data manipulation. *R Packag. version 2.7. 1.* <http://CRAN.R-project.org/package=gdata> (2010).
356. Weinberg, M. A. & Bral, M. Laboratory animal models in periodontology. *J. Clin. Periodontol.* **26**, 335–340 (1999).
357. Welbourne, T., Claville, W. & Langford, M. An oral glutamine load enhances renal acid secretion and function. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 660–3 (1998).
358. White, J. R., Nagarajan, N. & Pop, M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000352 (2009).
359. Whiteway, J. *et al.* Oxygen-Insensitive Nitroreductases: Analysis of the Roles of *nfsA* and *nfsB* in Development of Resistance to 5-Nitrofurantoin Derivatives in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 5529–5539 (1998).
360. Wilkinson, T. M. a *et al.* Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. *Chest* **129**, 317–24 (2006).
361. Wilkinson, T. M. a, Patel, I. S., Wilks, M., Donaldson, G. C. & Wedzicha, J. a. Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1090–5 (2003).

362. Wilkinson, T. & Wedzicha, J. a. Strategies for improving outcomes of COPD exacerbations. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **1**, 335–42 (2006).
363. Wilmes, P. & Bond, P. Towards exposure of elusive metabolic mixed-culture processes: the application of metaproteomic analyses to activated sludge. *Water Sci. Technol.* **54**, 217–226 (2006).
364. Wilson, K. H. & Blichington, R. B. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2273–8 (1996).
365. Wilson, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 412–418 (2004).
366. Wilson, M. *Microbial inhabitants of humans: their ecology and role in health and disease.* (Cambridge University Press, 2005).
367. Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4576–9 (1990).
368. Woese, C. R., Maniloff, J. & Zablen, L. B. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 494–8 (1980).
369. Woese, C. R., Sogin, M. L. & Sutton, L. A. Procaryote phylogeny. *J. Mol. Evol.* **3**, 293–299 (1974).
370. Woese, C. R. and G. E. F. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci* **74**, 5088–5090 (1977).
371. WOESE, C. R. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221–271 (1987).
372. Xanthou, M. Immune protection of human milk. *Neonatology* **74**, 121–133 (1998).
373. Xie, H. *et al.* Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J. Bacteriol.* **182**, 7067–9 (2000).
374. Y. Tian, X. He, M. Torralba, S. Yooseph, K. E. Nelson, R. Lux, J. S. McLean, G. & Yu, and W. S. NIH Public Access. *Mol Oral Microbiol* **25**, 357–367 (2010).
375. Yang, Y. *et al.* Cloning, heterologous expression, and functional characterization of the nicotinate dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *Biodegradation* **20**, 541–549 (2009).
376. Yarza, P. *et al.* The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**, 241–250 (2008).
377. Yelton, A. P. *et al.* Comparative genomics in acid mine drainage biofilm communities reveals metabolic and structural differentiation of co-occurring archaea. *BMC Genomics* **14**, 485 (2013).

378. Zaura, E., Keijser, B. J. F., Huse, S. M. & Crielaard, W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* **9**, 259 (2009).
379. Zee, K.-Y., Samaranayake, L. P., Attström, R. & Davies, W. I. R. Predominant cultivable microflora of supragingival dental plaque in Chinese individuals. *Arch. Oral Biol.* **41**, 647–653 (1996).
380. Zengler, K. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 712–29 (2009).
381. Zhu, L. & Kreth, J. The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 717843 (2012).
382. Zijngge, V. *et al.* Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One* **5**, e9321 (2010).
383. Sampling procedure. *Itself, Soli testsnCan Be No Better Than Sample 12*

ANEXO 1.1.

MID-77	ACGACAGCTC	MID-116	AGACTCAGCG
MID-78	ACGTCTCATC	MID-117	AGAGAGTGTG
MID-79	ACTCATCTAC	MID-118	AGCTATCGCG
MID-80	ACTCGCGCAC	MID-119	AGTCTGACTG
MID-81	AGAGCGTCAC	MID-120	AGTGAGCTCG
MID-82	AGCGACTAGC	MID-121	ATAGCTCTCG
MID-83	AGTAGTGATC	MID-122	ATCACGTGCG
MID-84	AGTGACACAC	MID-123	ATCGTAGCAG
MID-85	AGTGTATGTC	MID-124	ATCGTCTGTG
MID-86	ATAGATAGAC	MID-125	ATGTACGATG
MID-87	ATATAGTCGC	MID-126	ATGTGTCTAG
MID-88	ATCTACTGAC	MID-127	CACACGATAG
MID-89	CACGTAGATC	MID-128	CACTCGCACG
MID-90	CACGTGTCGC	MID-129	CAGACGTCTG
MID-91	CATACTCTAC	MID-130	CAGTACTGCG
MID-92	CGACACTATC	MID-131	CGACAGCGAG
MID-93	CGAGACGCGC	MID-132	CGATCTGTCTG
MID-94	CGTATGCGAC	MID-133	CGCGTGCTAG
MID-95	CGTCGATCTC	MID-134	CGCTCGAGTG
MID-96	CTACGACTGC	MID-135	CGTGATGACG
MID-97	CTAGTCACTC	MID-136	CTATGTACAG
MID-98	CTCTACGCTC	MID-137	CTCGATATAG
MID-99	CTGTACATAC	MID-138	CTCGCACGCG
MID-100	TAGACTGCAC	MID-139	CTGCGTCACG
MID-101	TAGCGCGCGC	MID-140	CTGTGCGTCTG
MID-102	TAGCTCTATC	MID-141	TAGCATACTG
MID-103	TATAGACATC	MID-142	TATACATGTG
MID-104	TATGATACGC	MID-143	TATCACTCAG
MID-105	TCACTCATAC	MID-144	TATCTGATAG
MID-106	TCATCGAGTC	MID-145	TCGTGACATG
MID-107	TCGAGCTCTC	MID-146	TCTGATCGAG
MID-108	TCGCAGACAC	MID-147	TGACATCTCG
MID-109	TCTGTCTCGC	MID-148	TGAGCTAGAG
MID-110	TGAGTGACGC	MID-149	TGATAGAGCG
MID-111	TGATGTGTAC	MID-150	TGCGTGTGCG
MID-112	TGCTATAGAC	MID-151	TGCTAGTCAG
MID-113	TGCTCGCTAC	MID-152	TGTATCACAG
MID-114	ACGTGCAGCG	MID-153	TGTGCGCGTG
MID-115	ACTCACAGAG		

Tabla anexo 1.1. “Códigos de barras” o “identificadores múltiples” (MID) integrados en los cebadores directos y utilizados para identificar las muestras analizadas. Varían en al menos 2 nucleótidos entre sí, para evitar asignaciones erróneas entre muestras.

ANEXO 3.1.

A (26)	Aeromonas; Algbacter; Aquicella ;Brachybacterium; Caldanaerobius; Carnobacterium; Citrobacter; Cryptomonadaceae; Desemzia; Dysgonomonas ;Gardnerella; Georgenia; Jeotgalicoccus; Jonesia; Klebsiella; Limnobacter; Methylibium; Mobiluncus; Nubsella; Rheinheimera; Rhodobacter; Roseburia; Sphingobacterium; Tumbacillus; Variovorax; Vibrio.
B (4)	Cardiobacterium; Geobacter; Pseudoramibacter; Sutterella.
C (19)	Alkanindiges; Atopostipes; Caulobacter; Chitinophaga; Cupriavidus; Derrxia; Dolosigranulum; Gordonia; Ilumatobacter; Lactibacter; Methylobacillus; Methyllobacterium; Ochrobacterum; Paenibacillus; Pantoea; Pseudoalteromonas; Pseudoxanthomonas; Sporacetigenium; Thermomonas.
D (38)	Achromobacter; Arcobacter; Azonexus; Azospirillum; Bdellovibrio; Blautia; Bosea; Castellaniella; Dermacoccus; Desulfomicrobium; Devosia; Dyadobacter; Emticicia; Flavisolibacter; Geothrix; GpIX; Hyphomicrobium; Iamia; Leuconostoc; Lysobacter; Marmoricola; Methylothera; Microcella; Odoribacter; Paludibacter; Pedobacter; Phenyllobacterium; Phocaeicola; Planobacterium; Porphyrobacter; Prostheco bacter; Rhodoferrax; Runella; Sediminibacterium; Serratia; Shewanella; Skermanella; Thermoanaerobacterium.
E (0)	
F (6)	Bacillus; Finegoldia; Hydrogenophaga; Hymenobacter; Janibacter; Janthinobacterium.
G (4)	Centipeda; Hallella; Jonquetella; Sneathia.
H (17)	Aerococcus; Arthrobacter; Atopobium; Bradyrhizobium; Brevibacterium; Cellvibrio; Clostridium; Comamonas; Curvibacter; Kluuyvera; ODI_genera_incertae_sedis; Polynucleobacter; Raistonia; Sphingopyxis; Tepidimonas; Turicella; Xanthomonas.
I (0)	
J (16)	Anaerococcus; Atopococcus; Bacillariophyta; Blastomonas; Chryseobacterium; Dechloromonas; Faecalibacterium; Gp4; Herbaspirillum; Lactococcus; Methylophilus; Methyloversatilis; Niastella; Peredibacter; Simpliciispira; Sporolactobacillus.
K (1)	Streptobacillus.
L (1)	Hydrogenophilus.
M (28)	Arcicella; Asticcacaulis; Brevundimonas; Cloacibacterium; Diaphorobacter; Enterobacter; Enterococcus; Escherichia/Shigella; Ferruginibacter; Flavobacterium; Fluviicola; Geobacillus; Kocuria; Leadbetterella; Legionella; Massilia; Microbacterium; Nocardioides; Novosphingobium; Paracoccus; Peptoniphilus; Pseudomonas; Psychrobacter; Rubrobacter; Schwartzia; Staphylococcus; Streptophyta; Zoogloea.
N (6)	Anaeroglobus; Bulleidia; Kingella; Mogibacterium; Peptostreptococcus; Selenomonas.
O (43)	Abiotrophia; Acidovorax; Acinetobacter; Actinobacillus; Actinomyces; Aggregatibacter; Aquabacterium; Bacteroides; Campylobacter; Capnocytophaga; Catonella; Corynebacterium; Dialister; Enhydrobacter; Eubacterium; Exiguobacterium; Fusobacterium; Gemella; Granulicatella; Haemophilus; Lactobacillus; Leptotrichia; Megaspheara; Micrococcus; Moraxella; Moryella; Mycoplasma; Neisseria; Oribacterium; Parvimonas; Porphyromonas; Prevotella; Propionibacterium; Rothia; SRI_genera_incertae_sedis; Solobacterium; Sphingomonas; Stenotrophomonas; Streptococcus; TM7_genera_incertae_sedis; Tannerella; Treponema; Veillonella.

Tabla suplementaria 3.1:

Lista de generos bacterianos unicos y compartidos entre todas las muestras bronquiales. Las letras de las columnas de la izquierda se refieren a las letras indicadas en la figura 4.

ANEXO 4.1

	Values
Maternal age (y)	32.01 ± 5.12 ¹
Weight before pregnancy (kg)	76.11 ± 13.87
Normal weight	62.88 ± 4.58
Obese	86.70 ± 8.17
BMI before pregnancy (kg/m ²)	27.71 ± 4.77
Normal weight	22.90 ± 1.11
Obese	31.86 ± 2.22
Maternal weight gain over pregnancy (kg)	12.45 ± 5.82
Normal weight	14.70 ± 5.60
Obese	10.49 ± 4.60
Duration of pregnancy (wk)	40.40 ± 1.11
Method of delivery (% vaginal)	50.0 (9/18) ²
Medical induction of labor by using Cytotec (Pfizer; oxitocin) (%)	11.1 (2/18)
Problems during pregnancy (%)	
Normal, no problems	88.8 (16/18)
Gestational diabetes	11.1 (2/18)
<i>Streptococcus</i> B positive	0 (0/18)
Other infections	0 (0/18)
Parity (%)	
1	33.3 (6/18)
2	33.3 (6/18)
>2	33.3 (6/18)
Sex (% female)	55.5 (10/18)
Infant head circumference at birth (cm)	35.28 ± 1.11
Infant weight (kg)	
At birth	3.69 ± 0.32
Age 6 mo	8.13 ± 0.90
Age 12 mo	9.87 ± 1.40
Age 24 mo	12.41 ± 1.03
Infant length (cm)	
At birth	51.25 ± 1.84
Age 6 mo	68.80 ± 2.82
Age 12 mo	76.50 ± 3.65
Age 24 mo	87.67 ± 2.80
Maternal antibiotic treatment (%)	
Before delivery	0 (0/18)
During delivery	16.6 (3/18)
After delivery	5.5 (1/18)
Infant antibiotic treatment (%)	
At birth	0 (0/18)
First months	0 (0/18)
Total time exclusively breastfeeding (mo)	4.10 ± 1.10
Breastfeeding at 1 mo (%)	100 (18/18)
Breastfeeding at 6 mo (%)	100 (18/18)
Infant diet at age 6 mo (%)	
Exclusively breast milk	0 (0/18)
Breast milk + formula	0 (0/18)
Breast milk + solid foods	66.7 (12/18)
Breast milk + formula + solid foods	33.3 (6/18)
Formula	0 (0/18)

¹ Mean ± SD (all such values).

² Percentage and prevalence reflect the percentage of the number of positive out of total samples included in the study.

Tabla 4.1. Características clínicas de los recién nacidos y sus madres (n=18) incluidos en el estudio.

ANEXO 4.2

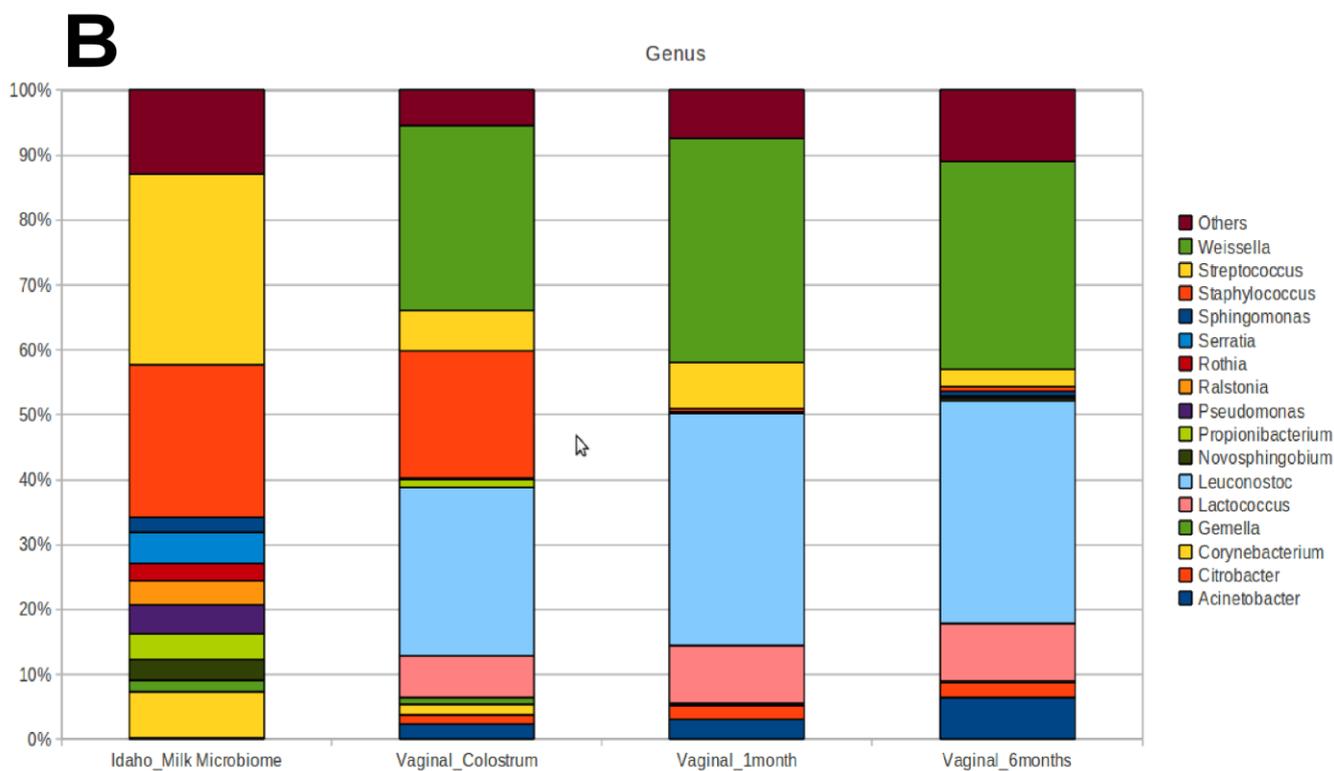
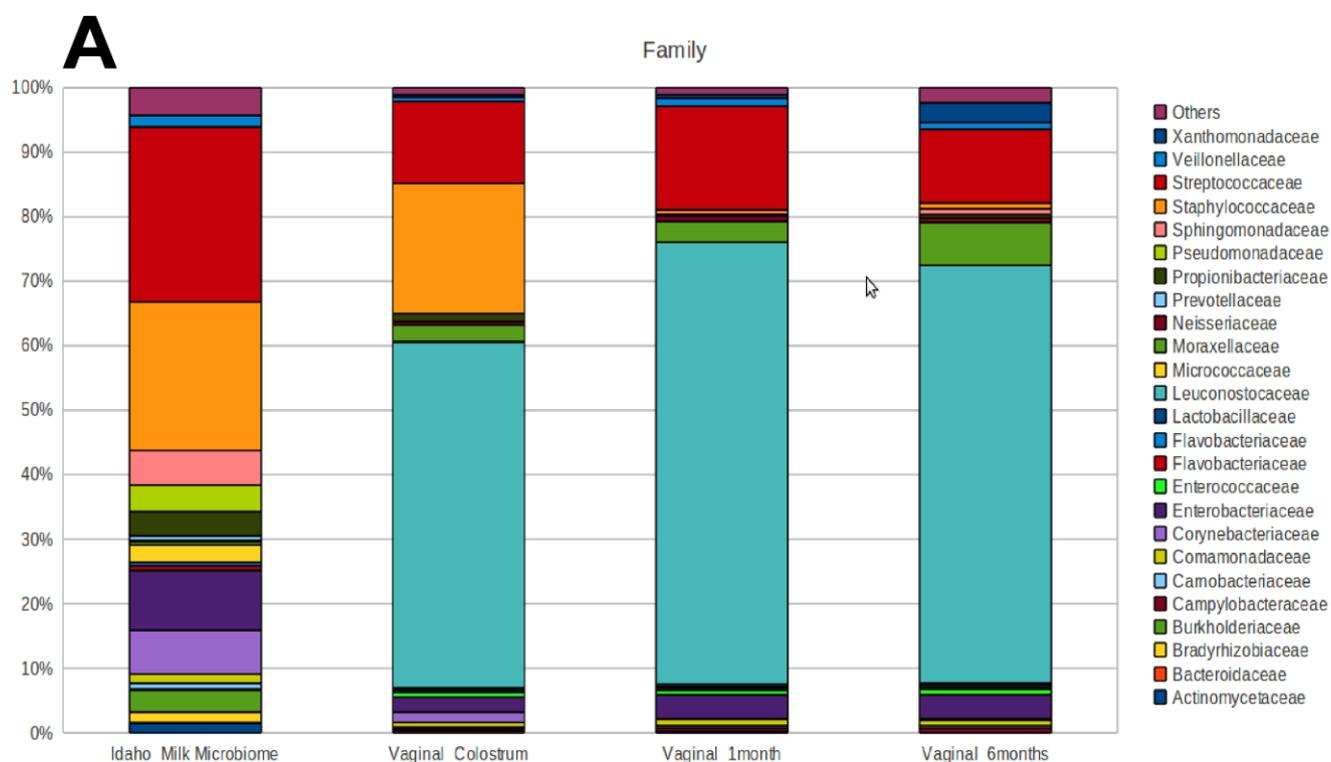


Figura 4.2. Asignación taxonómica comparada entre el trabajo de Hunt KM. y colaboradores del 2011 y este trabajo. A: a nivel taxonómico de familia. B: a nivel de género.

ANEXO 5.1

ChimpOR	
10AA	L-2-amino-thiazoline-4-carboxylic acid-Lcysteine conversion
112CBSS	Conjugative transfer related cluster
11CARBS	Central carbohydrate metabolism
128CBSS	Probably Ybbk-related hypothetical membrane proteins
131CBSS	Aerotolerance operon in Bacteroides and potentially orthologous operons in other organisms
133CBSS	Carotenoid biosynthesis
145CBSS	CBSS-316057.3.peg.563
148CBSS	Tricarboxylate transporter
14CARBS	One-carbon Metabolism
154CBSS	CBSS-562.2.peg.5158 SK3 including
159CBSS	Molybdopterin oxidoreductase
15CARBS	Monosaccharides
161CBSS	CBSS-316273.3.peg.2378
174CBSS	Cell wall related cluster
178CBSS	Sarcosine oxidase
198CELLDIV	MukBEF Chromosome Condensation
205CVP	Pyridoxine
210CVP	Lipoic acid
216DNA	DNA replication
221DNA	DNA recombination
222DNA	DNA structural proteins, bacterial
226FAT	Fatty acids
229FAT	Polyhydroxybutyrate metabolism
232IRON	Transport of Iron
233IRON	Campylobacter Iron Metabolism
238IRON	Iron acquisition in Streptococcus
244IRON	ABC-type iron transport system
258MC	Bacterial Chemotaxis
25CARBS	Unknown carbohydrate utilization (cluster Yeg)
262MISC	YbbK
26CARBS	VC0266
270N&N	Pyrimidines
273N&N	Adenosyl nucleosidases
292PHOT	Proteorhodopsin
298PMET	Phosphoenolpyruvate phosphomutase
299PMET	Phosphonate metabolism
301PROT	Protein biosynthesis
303PROT	Protein processing and modification
305PROT	Selenoproteins
306RESP	Electron donating reactions
307RESP	ATP synthases
308RESP	Electron accepting reactions
312RESP	Sodium Ion-Coupled Energetics
322RNA	Transcription

336SIGNAL	cAMP signaling in bacteria
338SIGNAL	Two-component regulatory systems in <i>Campylobacter</i>
346SIGNAL	WhiB and WhiB-type regulatory proteins
354SM	Thioredoxin-disulfide reductase
357SM	Sulfate reduction-associated complexes
363SPORE	Spore Core Dehydration
369STRESS	Heat shock
371STRESS	Periplasmic Stress
374STRESS	Hfl operon
395WALL	Peptidoglycan Biosynthesis
396WALL	Gram-Negative cell wall components
398WALL	Peptidoglycan biosynthesis-- <i>gjo</i>
399WALL	Cell wall of <i>Mycobacteria</i>
407WALL	Cell wall polysaccharide synthesis in <i>Thermotogales</i>
42CBSS	Isoprenoid/cell wall biosynthesis: PREDICTED UNDECAPRENYL DIPHOSPHATE PHOSPHATASE
47CBSS	Glycogen metabolism cluster
48CBSS	RNA modification and chromosome partitioning cluster
54CBSS	CBSS-562.2.peg.5158 SK3 including
64CBSS	Nucleoside Catabolism cluster
74CBSS	Cell wall related cluster
77CBSS	TldD cluster
79CBSS	CBSS-176279.3.peg.868
83CBSS	CTP synthase (EC 6.3.4.2) cluster
93CBSS	CBSS-87626.3.peg.3639
HealthyOR	
6AA	Glutamine, glutamate, aspartate, asparagine; ammonia assimilation
2AA	Aromatic amino acids and derivatives
1AA	Lysine, threonine, methionine, and cysteine
27CARBS	Carbon storage regulator
21CARBS	Aminosugars
19CARBS	Organic acids
18CARBS	Sugar alcohols
13CARBS	Di- and oligosaccharides
91CBSS	Possible Ammonia conversion cluster
88CBSS	CBSS-342610.3.peg.1794
82CBSS	CBSS-320372.3.peg.6046
81CBSS	Maltose utilization cluster
78CBSS	Ribonucleotide reductase cluster
73CBSS	RNA modification cluster
66CBSS	EC49-61
63CBSS	USS-DB-7
60CBSS	Lysine, threonine, methionine, and cysteine
56CBSS	CBSS-393121.3.peg.1913
55CBSS	Nucleotidyl-phosphate metabolic cluster
46CBSS	Carbohydrates
40CBSS	CBSS-235.1.peg.567
34CBSS	Fatty acid metabolic cluster
33CBSS	Conserved gene cluster associated with Met-tRNA formyltransferase
182CBSS	Bacteriophage P4 cluster
179CBSS	Conserved cluster in <i>Enterobacteriaceae</i> downstream from YqjA, a DedA family protein
177CBSS	PFGI-1-like cluster 2
170CBSS	Disulphide related cluster
155CBSS	DNA metabolism
152CBSS	Phosphate metabolism
146CBSS	Butyrate metabolism cluster

144CBSS	Spore Coat
142CBSS	Cluster with second YidC in Bacilli
138CBSS	CBSS-393133.3.peg.2787
129CBSS	CBSS-176299.4.peg.1996A
125CBSS	CBSS-193567.1.peg.90
120CBSS	EC699-706
105CBSS	CBSS-160492.1.peg.550
101CBSS	Cluster containing CofD-like protein and co-occurring with DNA repair
197CELLDIV	Control of cell elongation - division cycle in Bacilli
195CELLDIV	Two cell division clusters relating to chromosome partitioning
206CVP	Biotin
203CVP	NAD and NADP
202CVP	Tetrapyrroles
201CVP	Folate and pterines
220DNA	CRISPs
218DNA	Restriction-Modification System
243IRON	Iron Scavenging cluster in Thermus
236IRON	Heme, heme uptake and utilization systems in GramPositives
247KMET	Hyperosmotic potassium uptake
246KMET	Glutathione-regulated potassium-efflux system and associated functions
255MAC	carbazol degradation cluster
251MAC	Anaerobic degradation of aromatic compounds
250MAC	Metabolism of central aromatic intermediates
257MC	Flagellar motility in Prokaryota
264MISC	YaaA
260MISC	Plant-Prokaryote DOE project
275N&N	Pseudouridine catabolism
274N&N	Hydantoin metabolism
285NITRO	Nitrogen fixation
283NITRO	Nitric oxide synthase
279NITRO	Denitrification
278NITRO	Ammonia assimilation
289PHAGE	Plasmid related functions
288PHAGE	Transposable elements
286PHAGE	Phages, Prophages
304PROT	Protein folding
302PROT	Protein degradation
317RESP	Flavocytochrome C
315RESP	Carbon monoxide induced hydrogenase
314RESP	Biogenesis of cytochrome c oxidases
311RESP	Formate hydrogenase
309RESP	Biogenesis of c-type cytochromes
323RNA	Group II intron-associated genes
321RNA	RNA processing and modification
330SECM	Bacterial cytostatics, differentiation factors and antibiotics
329SECM	Plant Alkaloids
328SECM	Biosynthesis of phenylpropanoids
325SECM	Aromatic amino acids and derivatives
343SIGNAL	Orphan regulatory proteins
340SIGNAL	DNA-binding regulatory proteins, strays
353SM	Galactosylceramide and Sulfatide metabolism
352SM	Inorganic sulfur assimilation
361SPORE	Sporulation draft
360SPORE	Persister Cells
359SPORE	Sporulation-associated proteins with broader functions

379STRESS	SigmaB stress response regulation
376STRESS	Acid stress
372STRESS	Detoxification
370STRESS	Osmotic stress
368STRESS	Oxidative stress
392VIR	Bacteriocins, ribosomally synthesized antibacterial peptides
388VIR	Streptococcus agalactiae virulome
386VIR	C jejuni colonization of chick caeca
384VIR	Resistance to antibiotics and toxic compounds
406WALL	Peptidoglycan Crosslinking of Peptide Stems
402WALL	Recycling of Peptidoglycan Amino Acids
394WALL	Capsular and extracellular polysacchrides
CariesOR	
7AA	Histidine Metabolism
5AA	Arginine; urea cycle, polyamines
15CARBS	Monosaccharides
14CARBS	One-carbon Metabolism
12CARBS	Sugar utilization in Thermotogales
11CARBS	Central carbohydrate metabolism
95CBSS	Shiga toxin cluster
94CBSS	Shikimate kinase containing cluster
84CBSS	Methylamine utilization
77CBSS	TldD cluster
76CBSS	Lipopolysaccharide assembly cluster
69CBSS	CBSS-296591.1.peg.2330
68CBSS	CBSS-138119.3.peg.2719
48CBSS	RNA modification and chromosome partitioning cluster
47CBSS	Glycogen metabolism cluster
37CBSS	Clustering-based subsystems
36CBSS	Cell Division
178CBSS	Sarcosine oxidase
173CBSS	Putative sulfate assimilation cluster
168CBSS	PFGI-1-like cluster 1
166CBSS	CBSS-159087.4.peg.2189
165CBSS	Putative GGDEF domain protein related to agglutinin secretion
162CBSS	CBSS-83332.1.peg.3803
159CBSS	Molybdopterin oxidoreductase
157CBSS	CBSS-370552.3.peg.1240
149CBSS	Oxidative stress
145CBSS	CBSS-316057.3.peg.563
143CBSS	CBSS-316273.3.peg.227
140CBSS	Cluster with phosphopentomutase paralog
135CBSS	Putrescine/GABA utilization cluster-temporal,to add to SSs
133CBSS	Carotenoid biosynthesis
132CBSS	Sulfatases and sulfatase modifying factor 1 (and a hypothetical)
131CBSS	Aerotolerance operon in Bacteroides and potentially orthologous operons in other organisms
127CBSS	CBSS-83333.1.peg.946
116CBSS	CRISPRs and associated hypotheticals
198CELLDIV	MukBEF Chromosome Condensation
193CELLDIV	Bacterial Cytoskeleton
211CVP	Coenzyme M
210CVP	Lipoic acid
209CVP	Quinone cofactors
208CVP	Riboflavin, FMN, FAD
207CVP	Coenzyme A

204CVP	Thiamin biosynthesis
223DNA	YcfH
222DNA	DNA structural proteins, bacterial
219DNA	Type I Restriction-Modification
216DNA	DNA replication
215DNA	DNA repair
228FAT	Isoprenoids
226FAT	Fatty acids
244IRON	ABC-type iron transport system
242IRON	ABC transporter [iron.B12.siderophore.hemin]
240IRON	Ferrous iron transporter EfeUOB, low-pH-induced
238IRON	Iron acquisition in Streptococcus
235IRON	Siderophores
231IRON	Iron acquisition in Vibrio
245KMET	Potassium homeostasis
252MAC	Benzoate transport and degradation cluster
249MAC	Peripheral pathways for catabolism of aromatic compounds
258MC	Bacterial Chemotaxis
262MISC	YbbK
273N&N	Adenosyl nucleosidases
269N&N	Purines
280NITRO	Nitrosative stress
292PHOT	Proteorhodopsin
296PMET	P uptake (cyanobacteria)
305PROT	Selenoproteins
303PROT	Protein processing and modification
301PROT	Protein biosynthesis
318RESP	Quinone oxidoreductase family
308RESP	Electron accepting reactions
307RESP	ATP synthases
306RESP	Electron donating reactions
322RNA	Transcription
326SECM	Biologically active compounds in metazoan cell defence and differentiation
350SIGNAL	Pseudomonas quinolone signal PQS
348SIGNAL	Oxygen and light sensor PpaA-PpsR
342SIGNAL	Staphylococcal accessory gene regulator system
336SIGNAL	cAMP signaling in bacteria
335SIGNAL	Programmed Cell Death and Toxin-antitoxin Systems
357SM	Sulfate reduction-associated complexes
362SPORE	Sporulation gene orphans
374STRESS	Hfl operon
371STRESS	Periplasmic Stress
393VIR	Toxins and superantigens
390VIR	Streptococcus pyogenes Virulome
389VIR	Bacterial cyanide production and tolerance mechanisms

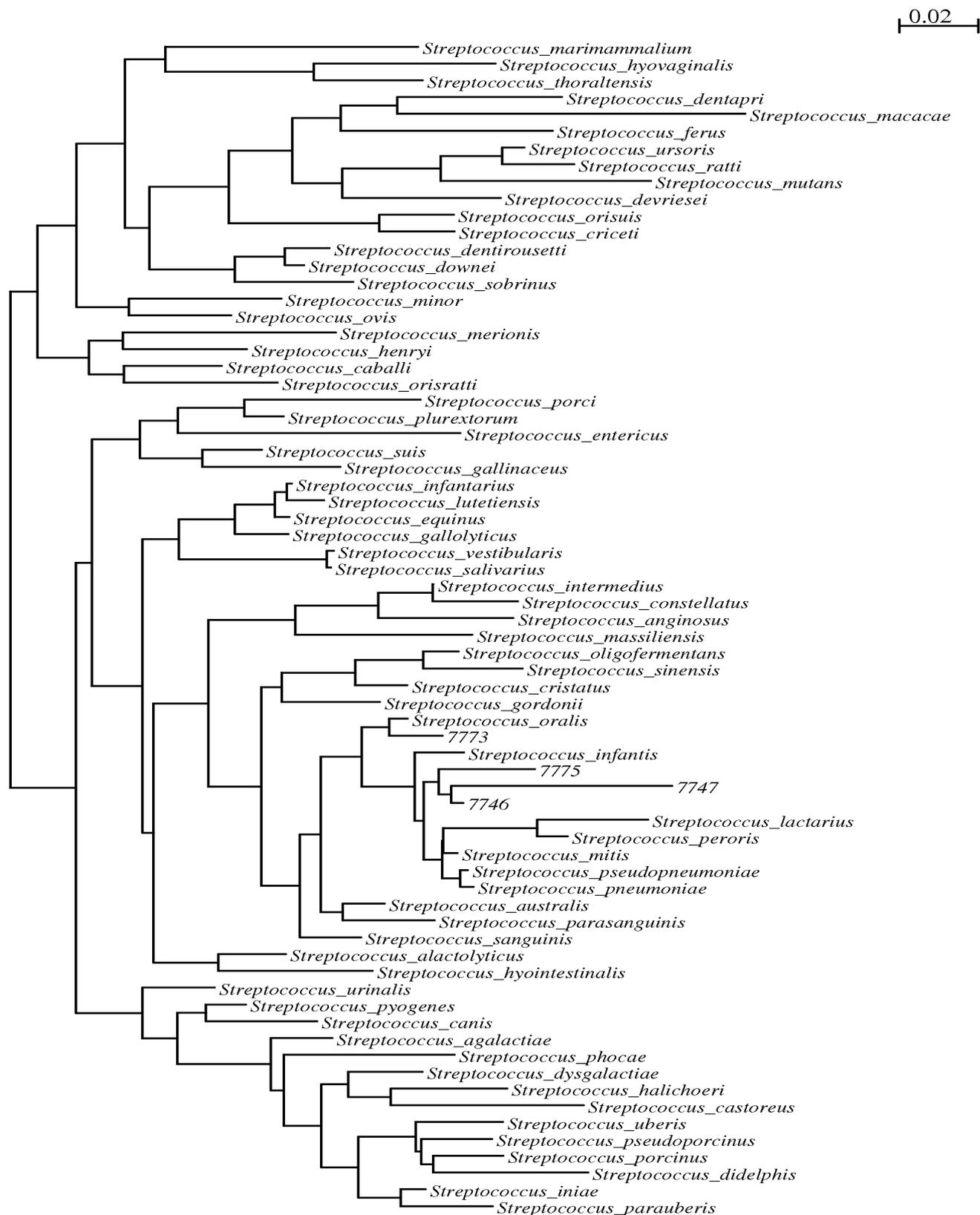
Tabla 5.1. Lista completa de las funciones de genes con diferencias significativas. Funciones sobre-representadas del chimpancé (chimpOR), funciones Funciones sobre-representadas de humanos sanos (HealthyOR) y Funciones sobre-representadas de humanos con caries (CariesOR).

TABLA ANEXA 6.1.

Position	SignalP	NB Classifier	Hidrophobic	Net Charge	Blast CAMP	Blast NR	PM(Da)
T1F							
0_34:630-801	+		+				6561,4351
-3_164:772-643	+						4988,048
-3_163:1105-1036			+				2693,2002
0_35:1362-1434			+				2921,3011
-3_162:1921-1831							3521,4866
-3_161:2224-2161							2502,1209
2_93:2171-2462					+		9445,3144
1_0:2593-2674							2935,3561
-1_215:2782-2689							3981,031
1_5:5758-5881		+				+HP	4412,2992
-2_91:7849-7777							2799,5304
2_94:9311-9380							2769,3353
-1_201:9520-9370				+			5957,7927
-1_198:11851-11788		+					2346,7488
-2_86:12100-11801						+HP	8295,8976
-3_153:14548-14488			+				2573,0502
2_98:14666-14735			+				2792,2431
0_61:42333-42456			+				4537,6014
T4H							
-2_67:8402-8333			+				2794,3408
-1_164:8687-8687				+			2158,5187
-1_151:16835-16769							2455,0137
-3_113_23315-23243		+	+				2781,2354
2_106:27656-27716							2528,07
-1_138:27521-27449			+				2729,4473
2_108:27887-27956							2572,1097
T9B							
-3_197:2066-2000							2692,3175
0_56:4383-4443							2393,8793
-3_187:8033-7955			+				3166,4016
-3_186:8171-8099		+	+				3004,4919
0_62:8205-8265			+				2479,8428
-1_220:11429-11354	+						2695,2323
0_66:11748-11811	+		+				2369,7226
0_68:12786-12867							3020,6821
0_69:13080-13143							2475,8754
1_26:18295-18364				+			2496,8583
-2_118:18791-18728			+				2382,8103
0_76:18843-18906		+					2452,9355
1_27:19117-19192							2941,5672
-2_112:25046-24959		+	+				2884,2517
-3:172:27923-27854	+	+	+				2806,2214
-2_106:28013-27950		+					2424,0296
-2_105:28202-28139			+				2478,9582
-1_205:28304-28217			+	+			3180,6553
-2_105:28202-28139			+				3290,8058
-1_205:28304-28217			+				2816,2006
1_49:31939-31999			+				2241,5875

Tabla anexa 6.1. Posibles genes responsables de la inhibición del crecimiento de *S. mutans* y *S. sobrinus*. Los signos “+” indican resultados positivos para la presencia de péptidos señal, composición de aminoácidos típica de péptidos antimicrobianos, hidrofobicidad, carga neta positiva, y similitud con péptidos antimicrobianos.

ANEXO 7.1



Anexo 7.1. Reconstrucción filogenética de los estreptococos con las secuencias obtenidas de los genes 16S ARNr de las cepas 7773, 7774, 7746 y 7747 (longitud >1400 pb) mediante el método de máxima verosimilitud (ML).

To be continued...

