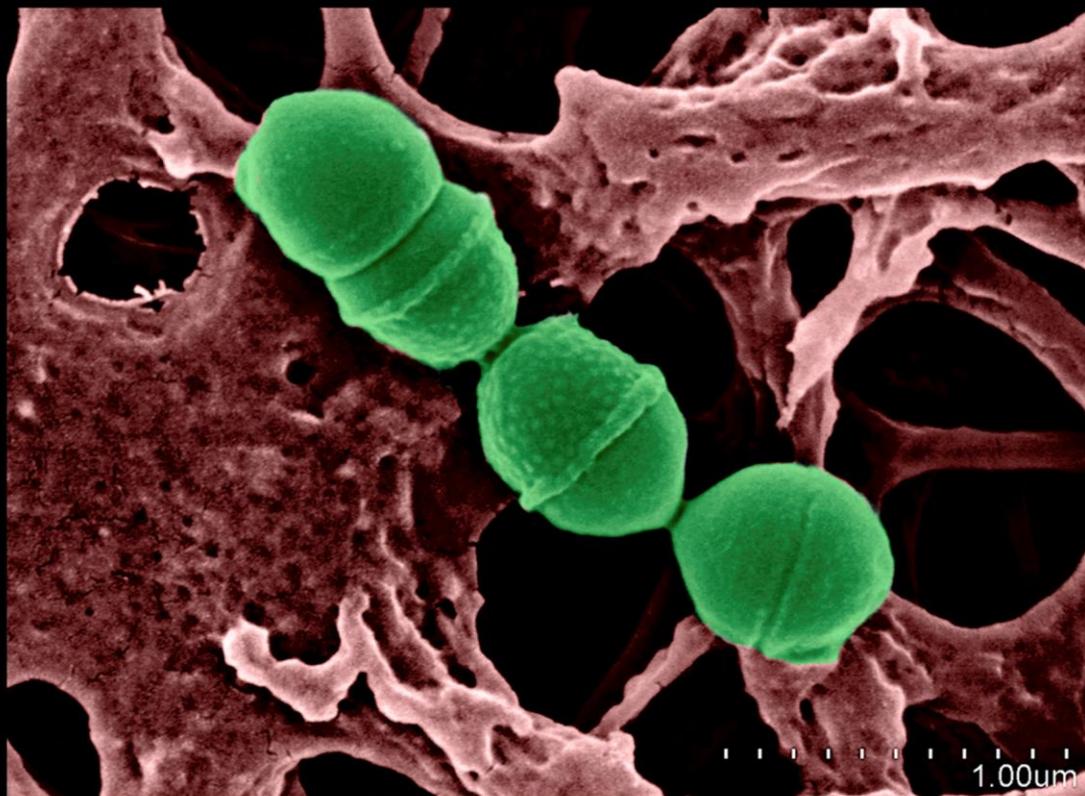


# *Desarrollo de Streptococcus dentisani sp. nov, como probiótico para la salud bucodental*



*Doctoranda:  
Anny Johanna Camelo Castillo*

*Director de Tesis:  
Alejandro Mira Obrador*

*Valencia 2018*

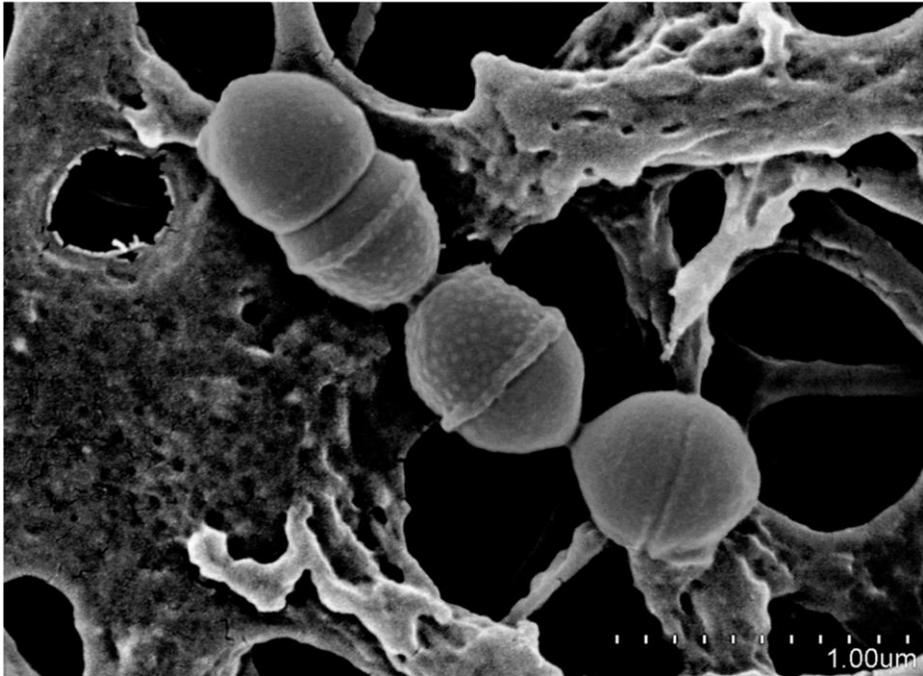


**Portada:** Imagen de *Streptococcus dentisani* sp.nov., obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (S-4800 - HITACHI).

**Contraportada:** Visualización microscópica del efecto ejercido por la cepa de *Streptococcus dentisani* sp.nov (verde), sobre la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (amarillo). La imagen fue obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (S-4800 - HITACHI).



*Desarrollo de Streptococcus dentisani sp. nov,  
como probiótico para la salud bucodental*



*Doctoranda:*  
Anny Johanna Camelo Castillo

*Director de Tesis:*  
Alejandro Mira Obrador

Valencia 2018

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

  
UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

 Facultat de  
Ciències Biològiques



*Savoir s'étonner à propos est le premier  
pas fait sur la route de la découverte*  
*Louis Pasteur*



El **Dr. Alejandro Mira Obrador**, investigador titular de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO).

**CERTIFICA:**

Que la tesis titulada "**Desarrollo de *Streptococcus dentisani* sp. nov., como probiótico para la salud bucodental**" ha sido realizada bajo su dirección en el Área de Genómica y Salud FISABIO-CSISP por Anny Johanna Camelo Castillo para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste, firma el presente certificado. En Valencia a 17 de diciembre de 2018

*Dr. Alejandro Mira Obrador*



*A mi abuelita Otilia*  
*A mis padres Luis G y Mery C*  
*A mis hermanas Lorena y Valentina*



## AGRADECIMIENTOS

Quizás, este sea el apartado más difícil de escribir en mi tesis, ya que es complicado reunir las palabras suficientes para agradecer a todas aquellas personas que han formado parte de este camino y de mi vida en estos últimos años...

Inicialmente quiero dar las gracias a mi mentor, Alex, y digo mentor ya que la palabra "Director de Tesis" se queda corta para referirme a él. Un mentor reúne todas las cualidades que tiene Alex, que van mucho más allá del simple hecho de dirigir una tesis doctoral, no solo ha sido para mí un guía científico, muchas veces me ha servido de consejero, de inspiración, de motivación. Admiro sin lugar a dudas su inteligencia, sus ideas, sus enseñanzas, su optimismo y sus palabras de ánimo. Gracias a la oportunidad que me dio al formar parte del "Cariátide Team" he aprendido a amar la investigación y ha logrado despertar en mí una curiosidad científica que no sabía que tenía dormida. ¡Mil gracias! Por todo Alex, muchas veces has tenido que hacer las veces de "padre" y más aun estando yo lejos de casa.

Mis agradecimientos continúan muy especialmente con Arantxa, con quien no solo realicé varios de los experimentos que se reflejan en esta tesis, sino con quien he tenido la oportunidad de aprender en el plano profesional y además crear lazos de amistad. Estoy inmensamente agradecida por toda tu ayuda durante estos últimos meses, por dedicar tu tiempo a revisar parte de los capítulos de esta tesis, por tus palabras de ánimo, por abrirme las puertas de tu casa y por escucharme muchas veces, que ya es bastante.

En este orden de ideas, debo agradecer a TODAS las personas que forman parte de mi "segundo hogar" el CSISP, sin lugar a dudas mis años en el laboratorio han sido de los mejores que he pasado en mi vida. Con el paso del tiempo, de las horas, de las noches y de los experimentos desde que comencé mi tesis de máster he aprendido a querer al centro, al área de Genómica y Salud, a los laboratorios, a toda la gente que trabaja allí, es estar como en mi casa. Me sentí y me siento orgullosa de formar parte de los becarios del centro y aunque la vida me lleve por otros caminos, siempre me seguirá embargando ese sentimiento de cariño y de cercanía con el CSISP. En el laboratorio conocí personas maravillosas y grandes amig@s. Personas que aunque pase el tiempo y la distancia, seguirán siendo muy especiales en mi vida, creo que no hace falta estar cerca o hablar con alguien a diario para llevarlo en el corazón. A todos los becarios de la sala uno, con los que pude compartir ya sea mucho o poco, a los que estaban cuando llegué y a los que fueron llegando poco a poco, a Ana E, Ana DJ, Leo, Bea, Galo, Irving, Carlos, Alba, Majda, Alejandra, Dani, Aurea,... Pero sobre todo, a Raúl y a Pedro, que no solo formaban parte del "Cariátide Team" sino que siempre me han ayudado las veces que lo he necesitado, a Pedro por sus consejos, sus regaños, sus palabras durante los buenos y los malos momentos. A los becarios de la sala dos, a María, Jorge, Rodrigo,... echo de menos esas buenas épocas de irnos de tapas al bar, de cenas, de "fiestas".

Continuo agradeciendo a todas las demás personas del área de Genómica y Salud, todos ellos me han enseñado que puedes hacer ciencia creando lazos de colaboración, sin disputas, sin egoísmos, sin conflictos por intereses de por medio. A Concha por su amabilidad, su ayuda y su buena disposición, a Loreto, Nuria, Sandra y como no a Loles, a quien debo hacer una mención especial ya que además de ayudarme siempre en la parte técnica y metodológica, me ayudo mucho emocionalmente, gracias Loles por todo el tiempo que compartimos juntas, por tus palabras, tus consejos, tu incondicionalidad, por permitirme ver como crecía mi "sobrino" Daniel en tu barriguita, por abrirme las puertas de tu casa y de tu familia. A todos los jefes de grupo, a los post-docs, en especial a Alfonso por toda su ayuda y su enseñanzas, Mariam, Pascual, a Artacho por su inmensa ayuda, siempre ha estado dispuesto a colaborar y facilitarnos la vida con

sus scripts, a todas las personas que de una u otra manera han hecho parte del área y que olvido mencionar.

También quiero agradecer al área administrativa, de comunicaciones y de gestión de proyectos del CSISP, a Mila, a Paco, a María Prada y a todos los que hacían más fáciles todos los trámites administrativos y burocráticos. Y para terminar, quiero dar las gracias especialmente a todo el equipo de seguridad del CSISP, siempre han estado dispuestos con una sonrisa, unas palabras de ánimo, una anécdota que contar, a Juaquina, a Marcos y en especial a Juan Carlos, a quien considero un amigo más, al final de un día largo o una noche, siempre sentaba bien hablar con ellos antes de irme a casa.

Al Dr. Manuel Martínez Bueno por permitirme hacer 2 estancias cortas en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada y a su post-doc Rubén Cebrián por su asesoría metodológica, sus enseñanzas y toda su ayuda durante mi estadia en su laboratorio.

Continúo los agradecimientos con mis amig@s, que son pocos, pero lo suficientemente incondicionales, ojala pudiera tenerlos cerca a todos. A Sera por su ayuda en la maquetación de la portada y contraportada de esta tesis, a mis amigas de licenciatura Sidnney, Yenny, Norfely, Carito, Yeniffer (Pechu) por sus palabras de ánimo y su cariño, pero sobre todo a Alexita que siempre ha estado ahí desde hace más de 15 años, dándome fuerzas, escuchándome o leyéndome y siempre apoyándome. A Daniel por su cariño y su incondicionalidad siempre que lo he necesitado y por supuesto al Gordo (Jimmy) a quien el paso de 19 años y el estar a más de 7000 km de distancia, no le han impedido apoyarme, escucharme o leerme y darme fuerzas.

Y por último y no por ello menos importante. Quiero dar las gracias inmensamente a mi familia, a mi abuelita Otilia, por su amor, su apoyo, sus palabras de cariño, de aliento, por sus regaños y por todo lo que me ha dado desde pequeña, gran parte de la mujer que soy hoy en día se lo debo a ella y el desarrollo de esta tesis y poder verla, aunque sea impresa, sé que le hará mucha ilusión. A mis padres por sus esfuerzos durante años para “sacarnos adelante” a mis hermanas y a mí, a mi padre Luis G por su tenacidad en el trabajo y en hacer todo lo posible para que nunca me faltara nada, sobre todo el estudio, que es como dice él “lo mejor que puede dejarnos”. A mi madre Mery C por su dedicación y entrega en mi crianza, por su amor incondicional, por su apoyo constante a pesar de la distancia y por los sacrificios y malos momentos que ha tenido que pasar, solo pensando en lo mejor para mí. A mis hermanas Lorena y Valentina, ya que, aunque no lo sepan, han sido muchas veces el aliciente para seguir adelante y no desfallecer, cada meta que me planteo la hago pensando siempre en ellas y en su futuro. A mi tía Gloria por su cariño, por ayudarme siempre en todo lo que ha podido y por sus consejos. A todos mis familiares que deje en Colombia buscando perseguir un sueño, que aunque no ha sido fácil, pienso que tarde o temprano tendrá sus recompensas. A JuanMa por el apoyo durante estos últimos meses de escritura de la tesis, A mis suegros por su cariño, por su apoyo y ayuda constante, por sus palabras de aliento y sus consejos.

...Y a mi pequeño angel de 4 patas que ha sido compañía noche y día durante la escritura de esta tesis y cuyas locuras han hecho que no colapsara por momentos.

ii GRACIAS A TODOS DE CORAZÓN!!

## ÍNDICE GENERAL

---



# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN GENERAL

Resumen General .....	23
-----------------------	----

## INTRODUCCIÓN GENERAL

1. <b>Introducción General</b> .....	27
1.1 Caries dental y su fisiopatología .....	36
1.2 Etiología de la caries dental .....	41
1.3 Importancia de las bacterias ácidogénicas .....	51
1.4 Tratamiento de la caries dental y estrategias preventivas .....	54
1.5 Probióticos y su importancia .....	63
1.6 Características beneficiosas de los probióticos orales .....	68
1.7 Caracterización de cepas con potencial probiótico .....	75
1.8 Descubrimiento de <i>Streptococcus dentisani</i> sp. nov. ....	77

## OBJETIVOS

1. <b>Objetivo General</b> .....	83
2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	83

## CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN DE LA NUEVA ESPECIE

1. <b>Introducción</b> .....	87
1.1 Aislamiento e identificación de <i>S. dentisani</i> .....	91
2. <b>Materiales y Métodos</b> .....	94
2.1 Características macroscópicas y microscópicas de las cepas .....	94
2.2 Características bioquímicas de las cepas .....	95
2.2.1 Pruebas de Catalasa y Oxidasa.....	95
2.2.2 Pruebas bioquímicas mediante galerías API.....	95
2.3 Análisis filogenéticos .....	97
2.4 Caracterización genómica .....	98
2.4.1 Genes de virulencia .....	99

2.4.2 Presencia de elementos móviles .....	99
2.5 Presencia en individuos sanos .....	100
2.6 Presencia en individuos de diversas localizaciones geográficas .....	101
2.7 Determinación de los niveles de <i>S. dentisani</i> en placa dental .....	103
2.8 Tests de inhibición (difusión en agar) .....	105
<b>3. Resultados .....</b>	<b>107</b>
3.1 Características macroscópicas y microscópicas de las cepas .....	107
3.2 Características bioquímicas de las cepas .....	110
3.2.1 Pruebas de Catalasa y Oxidasa .....	110
3.2.2 Pruebas bioquímicas mediante galerías API .....	110
3.2.3 Dendrograma API® .....	112
3.3 Análisis filogenéticos y genómicos .....	112
3.4 Caracterización genómica .....	118
3.4.1 Genes de virulencia .....	118
3.4.2 Presencia de elementos móviles .....	119
3.5 Presencia en individuos sanos .....	119
3.6 Distribución geográfica de <i>S. dentisani</i> a nivel global .....	122
3.7 Determinación de los niveles de <i>S. dentisani</i> en la placa dental .....	124
3.8 Tests de inhibición (difusión en agar) .....	124
<b>4. Discusión .....</b>	<b>126</b>

## **CAPÍTULO 2. MECANISMOS DE INHIBICIÓN Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS**

<b>1. Introducción .....</b>	<b>133</b>
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>147</b>
2.1 Inhibición de <i>Streptococcus dentisani</i> frente a patógenos orales .....	147
2.2 Inhibición comparada de fracciones del sobrenadante .....	149
2.3 Pruebas de peroxidasa y proteinasas .....	150
2.4 Descripción de la Isla Genómica de bacteriocinas en la cepa <i>S. dentisani</i> 7746 .....	152
2.5 Purificación y caracterización de los péptidos presentes en el sobrenadante de la cepa <i>S. dentisani</i> 7746 .....	153
<b>3. Resultados .....</b>	<b>159</b>
3.1 Inhibición de <i>Streptococcus dentisani</i> frente a patógenos orales .....	159

3.2 Inhibición comparada de fracciones del sobrenadante .....	161
3.3 Producción de peróxido y péptidos antimicrobianos .....	163
3.4 Descripción de la Isla Genómica de bacteriocinas en la cepa <i>S. dentisani</i> 7746 .....	164
3.5 Purificación y caracterización de los péptidos presentes en el sobrenadante de la cepa <i>S. dentisani</i> 7746 .....	167
<b>4. Discusión .....</b>	<b>175</b>

### **CAPÍTULO 3. CAPACIDAD TAMPÓN DE *S. dentisani***

<b>1. Introducción .....</b>	<b>181</b>
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>183</b>
2.1 Ensayos de transcriptómica global .....	183
2.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo .....	183
2.1.2 Extracción de ácidos nucleicos totales, purificación y cuantificación de RNA, y eliminación de RNA ribosómico .....	184
2.1.3 Síntesis de cDNA .....	185
2.1.4 Análisis de resultados .....	188
2.2 Experimentos de PCR cuantitativa (qPCR) .....	188
<b>3. Resultados .....</b>	<b>192</b>
3.1 Ensayos de transcriptómica .....	192
3.2 Experimentos de PCR cuantitativa (qPCR) .....	198
<b>4. Discusión .....</b>	<b>203</b>

### **CAPÍTULO 4. APTITUD TECNOLÓGICA**

<b>1. Introducción .....</b>	<b>209</b>
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>225</b>
2.1 pH y temperatura óptimos de crecimiento .....	225
2.2 Medio de cultivo para mejorar el crecimiento de la cepa y la inhibición de <i>S. mutans</i> .....	226
2.3 Condiciones óptimas para mejorar la inhibición frente a especies cariogénicas .....	227
2.4 Crecimiento en leche .....	228
2.5 Resistencia a antibióticos: Identificación <i>in silico</i> y en experimentos de dilución .....	229
2.5.1 <i>In silico</i> .....	229

2.5.2 En experimentos de dilución.....	230
2.6 Resistencia al proceso digestivo - Ensayo de digestión.....	231
2.6.1 Preparación de inóculos .....	234
2.6.2 Recuentos microbiológicos .....	234
2.7 Capacidad de producción de metabolitos no deseados.....	234
2.7.1 Cuantificación de la producción de ácido láctico.....	234
2.7.2 Cuantificación de la producción de aminas biógenas .....	235
2.7.3 Análisis de hidrólisis de sales biliares .....	236
2.8 Escalado del proceso fermentativo y obtención de biomasa .....	236
2.9 Resistencia de las cepas de <i>S. dentisani</i> al proceso de congelación y liofilización .....	238
2.10 Ensayos de toxicidad en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos .....	238
2.10.1 Cepas bacterianas, medio de cultivo y condiciones de crecimiento .....	238
2.10.2 Animales y diseño experimental .....	238
2.10.3 Protocolo de Inmunosupresión .....	239
2.10.4 Preparación del inóculo y administración .....	239
2.10.5 Verificación de la presencia de las cepas en heces .....	240
2.10.6 Evaluación de la translocación de las cepas a órganos extraintestinales...	241
2.10.7 Estudios histopatológicos .....	241
<b>3. Resultados .....</b>	<b>242</b>
3.1 pH y temperatura óptimos de crecimiento .....	242
3.2 Medio de cultivo para mejorar el crecimiento de la cepa y la inhibición de <i>S. mutans</i> .....	243
3.3 Condiciones óptimas para mejorar la inhibición frente a especies cariogénicas .....	246
3.4 Crecimiento en leche .....	246
3.5 Resistencia a antibióticos: Identificación <i>in silico</i> y en experimentos de dilución .....	247
3.5.1 <i>In silico</i> .....	247
3.5.2 Identificación mediante experimentos de dilución.....	249
3.6 Resistencia al proceso digestivo - Ensayo de digestión.....	251
3.6.1 Control de pH en el estómago e intestino .....	251
3.6.2 Recuento microbiano en un blanco de digestión gástrica .....	252

3.6.3 Resultados de resistencia tras el proceso de digestión gástrica .....	253
3.7 Capacidad de producción de metabolitos no deseados.....	254
3.7.1 Cuantificación de la producción de ácido láctico.....	254
3.7.2 Cuantificación de la producción de aminas biógenas .....	254
3.7.3 Análisis de hidrólisis de sales biliares .....	255
3.8 Escalado del proceso fermentativo y obtención de biomasa .....	255
3.8.1 Optimización de los parámetros y condiciones de crecimiento a pequeña escala .....	255
3.9 Escalado industrial para las cepas <i>S. dentisani</i> 7746 y 7747 .....	258
3.10 Resistencia de las cepas de <i>S. dentisani</i> al proceso de congelación y liofilización .....	259
3.11 Ensayos de toxicidad en animales: Ingesta aguda de <i>S. dentisani</i> en modelo de ratón .....	260
<b>Ratones Inmunocompetentes</b>	
3.11.1 Evaluación de la translocación de las cepas a órganos extraintestinales...	261
3.11.2 Estudios histopatológicos de tubo digestivo.....	261
3.11.3 Detección y cuantificación de las cepas en heces.....	263
<b>Ratones Inmunodeprimidos</b>	
3.11.4 Evaluación de la translocación de las cepas a órganos extraintestinales...	266
3.11.5 Estudios histopatológicos de tubo digestivo .....	266
3.11.6 Detección y cuantificación de las cepas en heces.....	268
4. <b>Discusión</b> .....	270
 <b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	
1. <b>Discusión General</b> .....	273
 <b>CONCLUSIONES</b>	
1. <b>Conclusiones</b> .....	289
 <b>APÉNDICE</b>	
1. <b>Informe sobre la pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de <i>S. dentisani</i></b> .....	293
2. <b>Publicaciones relacionadas con la tesis</b> .....	311
3. <b>Otras publicaciones</b> .....	347
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
1. <b>Bibliografía</b> .....	353



## RESUMEN GENERAL

---



## RESUMEN GENERAL

Las enfermedades orales como la caries se encuentran entre las más prevalentes en todo el mundo y se desarrollan como consecuencia de una disbiosis microbiana. Probablemente por esta naturaleza polimicrobiana y altamente variable, las aproximaciones de inmunización no son efectivas, y el uso de pre y probióticos que restablezcan la homeostasis han sido propuestas como alternativas prometedoras.

Durante años se han probado varias cepas bacterianas como posibles organismos promotores de la salud oral, pero generalmente son especies aisladas de nichos distintos al sitio donde deben ejercer su acción probiótica final, típicamente de muestras fecales. Nuestra hipótesis defiende que los comensales orales asociados a condiciones de salud serán más efectivos que las especies probióticas tradicionales asociadas a intestino, en un aspecto tan clave como la colonización del nicho dental. Además, el usar cepas propias de la cavidad oral ayudaría a solventar problemas prácticos, como la seguridad, la toxicidad de las cepas y el establecimiento de las dosis adecuadas para su administración.

En la presente tesis, se han realizado estudios genómicos, taxonómicos y bioquímicos en dos cepas de estreptococos aisladas de placa dental en individuos sin antecedentes de caries dental. Mediante análisis de los genes 16S, 23S y *sodA* y los valores de Identidad Nucleotídica Promedio (ANI), se demostró que estas cepas pertenecían al grupo *mitis*, pero ambas se agrupaban en una nueva rama filogenética, proponiendo para estos aislados el nombre de *Streptococcus dentisani* sp. nov. La especie propuesta es detectada en el 98% de las muestras de placa dental

de individuos sanos en niveles de  $10^8$  bacterias totales en placa supragingival y, tras experimentos *in vivo* e *in vitro* en las cepas 7746 y 7747, se pudo comprobar que no produce ningún metabolito secundario tóxico, no presenta genes de virulencia ni presencia de elementos móviles en su genoma, no sobreviven a una digestión estomacal en simulador *in vitro*, y experimentalmente no presentan resistencia frente a los antibióticos comúnmente usados en clínica, lo que evita posibles efectos secundarios.

Además, pudimos demostrar que esta especie tiene una doble acción beneficiosa, ya que inhibe el crecimiento de los principales patógenos orales a través de la producción de al menos seis bacteriocinas, y también amortigua el pH ácido (la causa principal de la caries dental) a través de la vía arginolítica, que activa en presencia de arginina y en condiciones de pH ácido para producir amonio. Por todo ello, proponemos el uso de *S. dentisani* como un probiótico prometedor para la mejora de la salud bucodental, cuya eficacia deberá probarse en ensayos clínicos en seres humanos.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

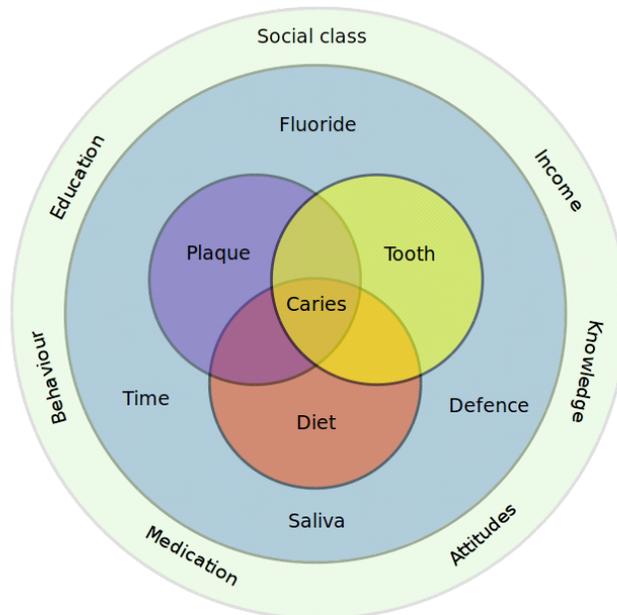
---

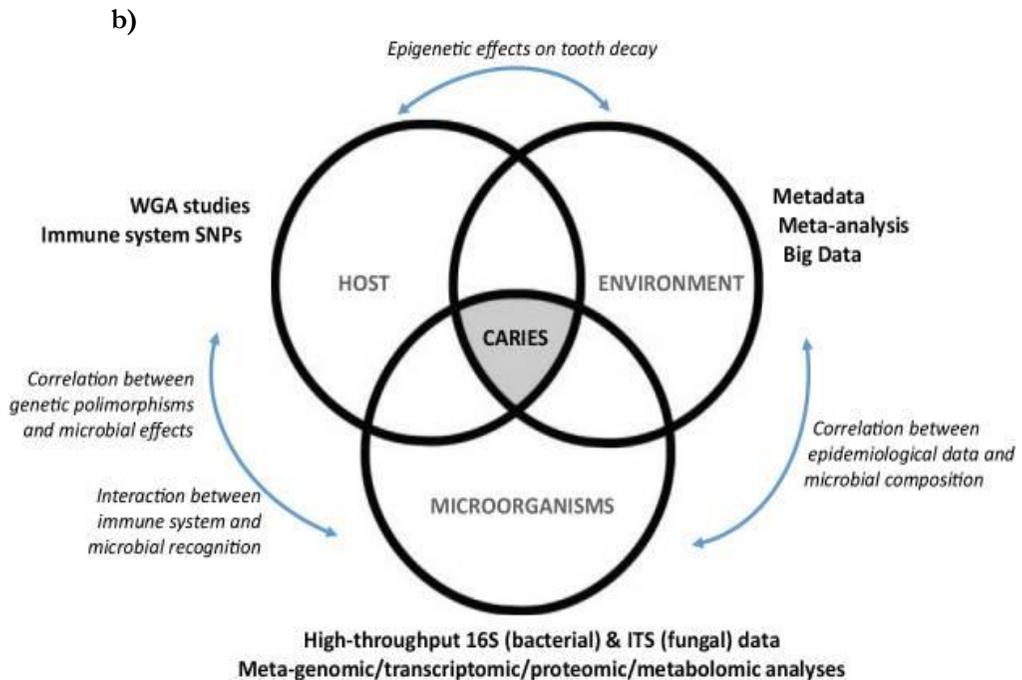


## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La caries es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana (Marsh, 1994). Es una de las patologías con mayor prevalencia mundial ya que afecta a entre un 60% y un 90% de los niños en edad escolar, y a una gran mayoría de la población adulta (90%) (Petersen and Lennon, 2004). La destrucción química dental se asocia a múltiples factores, como la ingesta y fermentación de los azúcares y ácidos contenidos en bebidas y alimentos, la edad del individuo, sexo, nivel socio económico, pastas dentales inadecuadas, deficiencia en la higiene dental (falta de cepillado dental, ausencia de hilo dental), variaciones del pH salival, y predisposición genética, entre otros factores, como muestran las Figuras I1a y I1b.

a)





**Figura I1. a) Diagrama de Keyes representando el origen multifactorial de la caries dental.** Los círculos representan los factores que pueden jugar un rol más importante (los genéticos o asociados al hospedador, los microbianos y los externos o ambientales) y, rodeándolos, las condiciones que los afectan (adaptado de ten Cate, 2009). **b)** Con la llegada de las técnicas “ómicas” y bioinformáticas, el papel de cada uno de estos factores y sus interacciones se han podido estudiar en un grado de detalle sin precedentes (tomado de Nascimento *et al.*, 2017).

Ninguno de los factores conocidos que influyen en la enfermedad ha demostrado ser suficiente por sí solo para provocar la aparición de caries, ya que hay al menos cuatro factores fundamentales que han de confluir: acumulación de placa dental cariogénica; una superficie del diente cuya forma, disposición y composición la hagan susceptible de sufrir caries; presencia de hidratos de carbono fermentables, y la co-ocurrencia de todos estos factores a lo largo del tiempo, haciendo de la caries una enfermedad crónica (Fejerskov, Nyvad and Kidd, 2015).

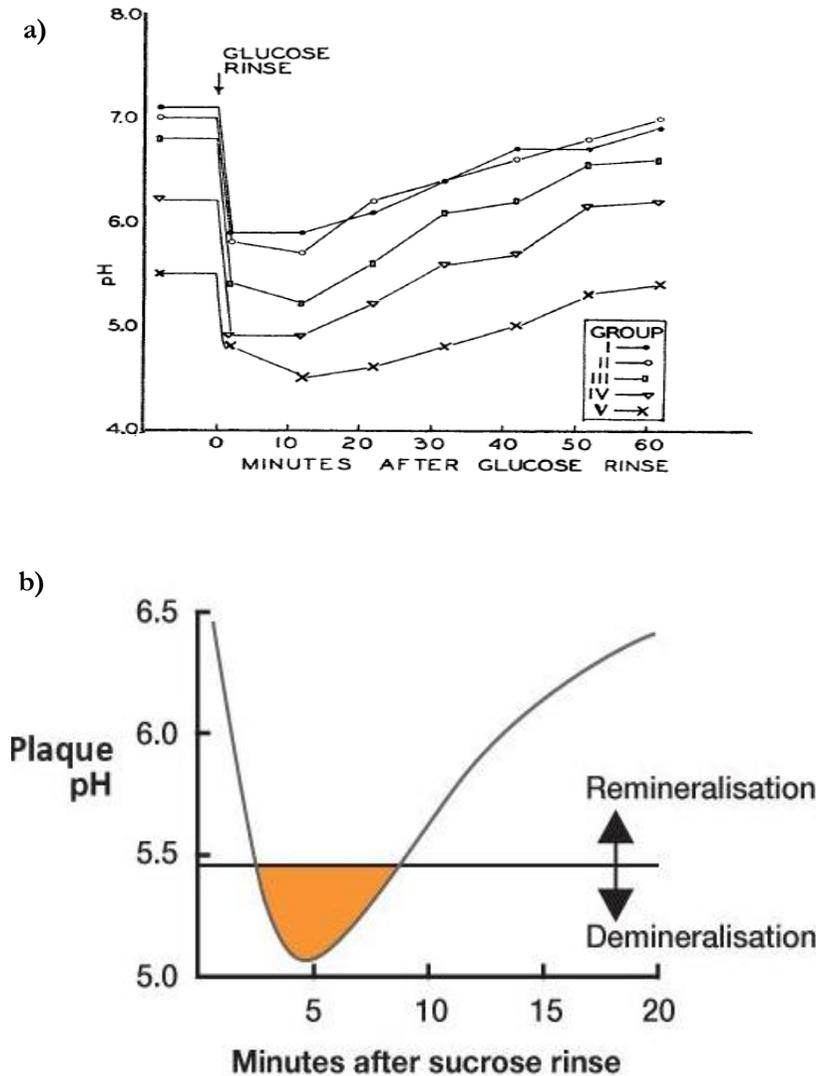
La acumulación de biopelícula es uno de los pre-requisitos para la aparición de caries dental. Por tanto, los lugares donde se desarrolla placa dental durante largos periodos de tiempo son más propensos a la formación de caries. La

formación de placa dental impide el efecto tampón de la saliva, reteniendo por periodos más largos los ácidos generados por la microbiota de la cavidad oral. Por esta razón, los lugares protegidos de las fuerzas mecánicas (cepillado de los dientes, masticación, movimientos de la lengua, entre otros), como lo son surcos o fisuras de las superficies oclusales, superficies proximales y margen gingival, son lugares que se ven favorecidos para la aparición de caries. Sin embargo, todas las superficies de los dientes son potencialmente capaces de sufrir caries dental, si durante periodos de tiempo prolongados se acumula placa, como usualmente se observa en pacientes de ortodoncia (Richter *et al.*, 2011).

Otro factor clave para la aparición de caries es el potencial de patogenicidad del biopelícula establecida (Loesche, 1986). La capacidad de producir ácido de forma sostenida en el tiempo mediante la fermentación de los hidratos de carbono es la principal característica patogénica asociada a la formación de caries. De hecho, se ha demostrado que las biopelículas con una mayor capacidad para el transporte de azúcares fermentables en el interior de las células (sistemas fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa, PEP-PTS) son más patogénicas (Deutscher, Francke and Postma, 2006). El incremento en la producción de ácido, reduce progresivamente los niveles de pH, generando un ambiente ácido. Es en este momento cuando el biopelícula cariogénica debe ser capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo, continuar creciendo y metabolizando azúcares, con el fin de degradar constantemente el esmalte. Por último, tanto la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) como intracelulares (IPS), contribuyen a la formación del biopelícula y al almacenamiento de energía, respectivamente. Los EPS también contribuyen a retener los ácidos localizados, por lo que la actividad tampón de la saliva se dificulta. Por otro lado, los IPS son utilizados bajo periodos de ayuno y al ser metabolizados ayudan a prolongar la producción de ácido, cuando el azúcar proveniente de fuentes alimenticias se está agotando. (Gibbons and Socransky, 1962; Freedman and Coykendall 1975; Busuioc *et al.*, 2009).

La ingesta de azúcares fermentables es la principal fuente de producción de ácido en las biopelículas dentales. Su metabolización produce compuestos ácidos como subproductos, que disminuyen el pH, favoreciendo las condiciones para el crecimiento de bacterias acidogénicas y acidúricas. En el año 1940 el Dr. Robert Stephan estudio el impacto de la saliva, en la neutralización de este descenso de pH de la placa (Stephan, 1944). Para ello, realizó experimentos donde los voluntarios realizaban un enjuague bucal con glucosa, observando que pasados 2-5 minutos el pH descendía hasta niveles críticos (dependiendo del grupo, Figura I2), por debajo de los cuales se produce una desmineralización que daña el esmalte y lo hace susceptible del ataque por microorganismos. Sin embargo, gracias a la acción de la saliva, el pH volvía a sus niveles de equilibrio pasados de 15 a 40 minutos, dependiendo de las características de la saliva de cada individuo/grupo. Para las mediciones de pH el Dr. Stephan utilizó microelectrodos de antimonio permanentes, que le permitían monitorizar las variaciones de pH de la placa *in situ*, y los resultados observados los reflejó en un gráfico conocido como "la Curva de Stephan" (Figura I2a, I2b).

Pero probablemente, la primera confirmación del importante papel de los azúcares en la aparición de caries dental se basa en el controvertido estudio Vipeholm. En éste, se administraba con frecuencia altas dosis de azúcar y caramelos a un grupo de pacientes con discapacidad mental, para comprobar si su consumo estaba relacionado con la aparición de la caries (Gustafsson *et al.*, 1953). El resultado fue un aumento de la prevalencia de caries y la pérdida de piezas dentales en la mayoría de los pacientes que recibieron azúcares. Posteriormente, experimentos *in vivo* demostraron que la disminución de pH en la placa dental estaba ocasionada por la fermentación de los diferentes azúcares de los alimentos (Rugg-Gunn *et al.*, 1975).



**Figura 12. Stephan Curve.** a) Figura original del estudio del Dr. Stephan, en la que se observan las curvas de pH en placa dental de la superficie en los dientes anteriores superiores. Los resultados se muestran por grupos con diferentes niveles de caries. **Grupos:** I: Sin caries II: Caries previa, pero inactiva al momento del estudio III: Caries leve IV: Caries marcada V: Caries extrema b) Dinámica general de los cambios de pH en la placa dental, con los procesos de re- y desmineralización dependiendo de un umbral crítico que suele estar alrededor de 5.5.

Otros factores que afectan al desarrollo de la caries dental son debidos a la variabilidad genética de los individuos, como quedó patente en el estudio Vipeholm (Gustafsson *et al.*, 1954). En este estudio también se investigó la

incidencia de la caries en las familias de los pacientes, encontrándose una prevalencia significativamente menor en los pacientes sin caries en comparación con las familias de los pacientes propensos a desarrollar caries (Böök and Grahnén, 1953). Estudios en gemelos han aportado una valiosa información al respecto (Townsend *et al.*, 2003), ya que varios indicadores de caries muestran una alta concordancia en gemelos monocigóticos, pero no en gemelos dicigóticos (Boraas, Messer, and Till, 1988). Aunque en la actualidad son escasos los estudios de asociación genética (WGA, por sus siglas en inglés, Whole Genome Association) con el desarrollo de caries dental (Figura I1b), algunas investigaciones han demostrado un mayor riesgo de caries en individuos con variación genética en genes de la ruta gustativa (TAS2R38 y TAS1R2); genes que podrían estar asociados con el riesgo o protección frente caries dental (Wendell *et al.*, 2010), genes involucrados en la formación del esmalte (Patir *et al.*, 2008), componentes salivales (Küchler *et al.*, 2013) y sistema inmune (Acton *et al.*, 1999; Lehner, Russell, and Caldwell, 1980). Por otra parte, las condiciones ambientales pueden afectar también de forma indirecta en la proliferación de la caries dental, por los cambios epigenéticos (Brook, 2009; Chmurzynska, 2010).

Los factores de carácter socio-económico influyen también en la aparición de caries. El grupo étnico, el nivel educativo, el nivel de ingresos, y la situación laboral, entre otros, tienen un impacto en la calidad de la higiene bucal y el número de visitas al odontólogo (Chi *et al.*, 2014).

Uno de los mecanismos de protección de los seres humanos contra la caries dental, es la secreción de saliva, ya que sus componentes son capaces de controlar y compensar la desmineralización ácida causada por las bacterias de la placa dental. El flujo salival continuo hace un lavado de las células bacterianas impidiendo su adhesión, y las proteínas salivales como peroxidasa, inmunoglobulinas, histatinas, lactoferrinas, lisozimas, defensinas, aglutininas, cistatinas, y mucinas, entre otras (Wei, 2006), inhiben el crecimiento de los

microorganismos, reduciendo la cantidad de biopelícula que se forma sobre las superficies dentales.

La superficie de los dientes está recubierta por una película formada por glucoproteínas salivales, a la que se adhieren los microorganismos. La formación de esta película adquirida proporciona una capa de líquido estático que no se elimina fácilmente por el cepillado de los dientes, ni por los movimientos normales de masticación o movimientos de la lengua. Esto hace que, en la película adquirida, se genere una capa libre de bacterias entre la biopelícula y la superficie de los dientes, que actúa como una barrera de difusión (Abdel-Aziz and A, 2014), evitando que los ácidos lleguen a la superficie de los dientes. La elevada concentración de calcio y fosfato satura la película, evitando los procesos de desmineralización, o incluso revirtiendo el proceso mediante el depósito de nuevos iones minerales en la superficie del esmalte. Finalmente, la precipitación del mineral presente en el fluido salival, sobre la placa dental puede conducir a la formación de cálculos, con la creación de una matriz inorgánica que se adherirá firmemente sobre la superficie del diente y atraparán en su interior a las bacterias presentes en la placa dental (Blanco *et al.*, 1997). Además, como la película adquirida es el ancla donde están unidos los colonizadores iniciales, diferentes polimorfismos en las proteínas absorbidas, pueden seleccionar el conjunto de bacterias que serán adheridas, determinando una composición microbiana o sana o propensa a enfermedades. Está demostrado que la saliva juega un papel importante en el control de la caries y su falta de producción determina problemas graves de caries dental, como los que se observan en el síndrome de Sjögren (Ahmadi *et al.*, 2013).

El flúor se ha incluido como un factor importante para detener el desarrollo de la caries. Se relacionó por primera vez en 1923 gracias a las observaciones del odontólogo Frederick McKay en manchas de esmalte en una subpoblación de Colorado Springs. Los habitantes de esta región tenían una coloración marrón en el esmalte que fue denominada "mancha marrón de Colorado", y que les

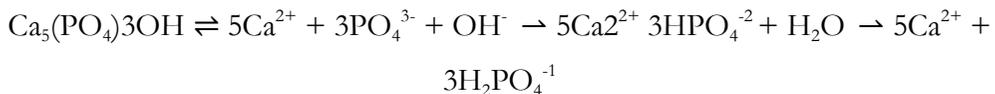
hacia extremadamente resistentes a la caries dental (Douglas, 1959). La comparación entre los suministros de agua de las poblaciones que presentaban estos síntomas y las que carecían de ellos, permitió descubrir que las sales de flúor presentes en el agua potable eran la razón de esta coloración y conferían resistencia frente a los ácidos en las piezas dentales (Peterson, 1997). Desde entonces, la adición de fluoruro al agua potable (Harding and O'Mullane, 2013), pastas de dientes, sal de mesa (Marthaler, 2013), o leche (Banoczy, Rugg-Gunn and Woodward, 2013), se ha convertido en la intervención de salud pública más eficaz para la prevención de la caries dental (Jones *et al.*, 2005; Petersen and Lennon, 2004). El bajo coste de las sales de fluoruro y la posibilidad de suplementar productos esenciales con este compuesto han permitido una reducción significativa de la prevalencia de caries, y sin efectos adversos probados (Jones *et al.*, 2005). La aparición de cáncer se propuso como un posible efecto secundario tras la administración de suplementos de fluoruro en el agua potable, ya que en estudios realizados en animales de laboratorio se encontraron evidencias “equivocas” (inciertas) de osteosarcoma en ratas macho (National Toxicology Program, 1990). Sin embargo, en estudios posteriores no se encontraron diferencias significativas en el riesgo de padecer osteosarcoma entre regiones con agua fluorada y regiones con agua no fluorada (Blakey *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2011; Levy and Leclerc, 2012).

### **1.1 Caries dental y su fisiopatología**

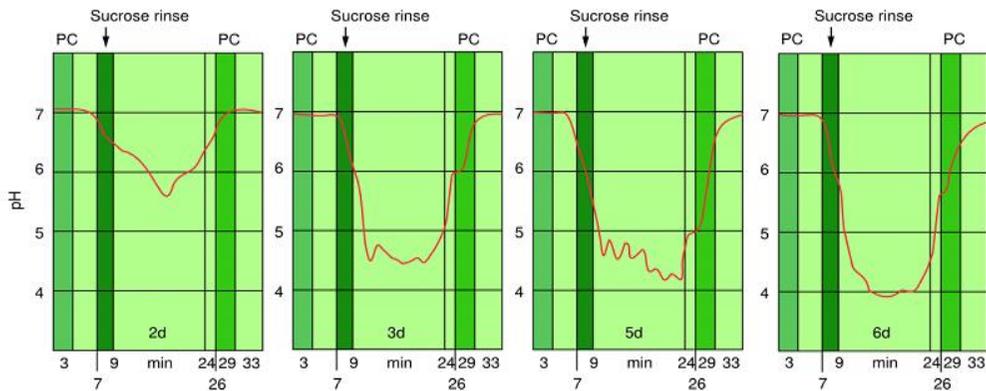
La caries dental es definida como resultado de la disolución de la superficie orgánica y mineral del diente, causada en gran parte por los ácidos producidos por los microorganismos de la placa dental supragingival, que crecen sobre la lesión (Fejerskov and Kidd, 2008). En general, para todos los tipos de lesiones de caries, los molares son los dientes más afectados, seguidos por los premolares y dientes anteriores. La caries coronal es una enfermedad predominante en

niños, aumentando de forma considerable a los quince años de edad y luego disminuyendo en la edad adulta temprana. La caries superficial de raíz afecta particularmente las superficies proximales de los dientes de la mandíbula y generalmente se produce en la edad adulta. La fisiopatología de la caries dental va ligada a cada una de las partes que conforman el diente, desde la porción distal hasta la pulpa, y puede llegar incluso a penetrar por el canal de la raíz provocando la destrucción y formación de abscesos en la misma (Fejerskov and Kidd, 2008).

En condiciones de pH neutro, existe un equilibrio entre la desmineralización y remineralización del esmalte, ya que la película adquirida sobre éste está saturada de hidroxiapatita. Cuando el pH baja fruto del metabolismo microbiano de azúcares fermentables, la solubilidad de la hidroxiapatita aumenta y se favorece la desmineralización del esmalte. La siguiente ecuación explica el proceso químico que ocurre durante estos períodos de mineralización y desmineralización, donde los protones adicionados eliminan los fosfatos y los grupos hidroxilo, convirtiéndolos en agua y  $\text{HPO}_4^{-2}$  ó  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$



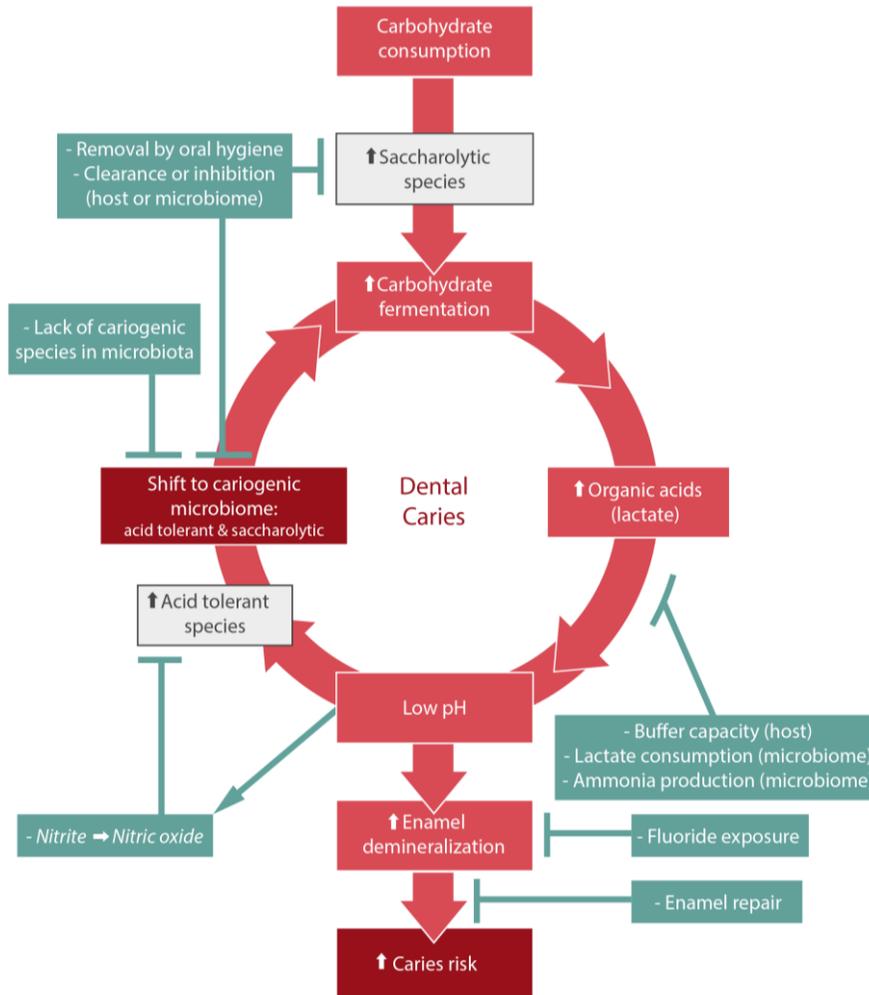
Una vez los azúcares dejan de estar disponibles, la capacidad tampón de la saliva hace aumentar de nuevo el pH, restableciéndose el equilibrio. Además, la película adquirida, sobresaturada de iones fosfato y calcio, favorece su precipitación y la remineralización del esmalte. Es importante tener en cuenta que la bajada de pH tras la ingestión de azúcares es mayor, cuanto mayor es la formación de placa dental, de tal manera que cuanto más tiempo transcurre desde el cepillado dental, el período durante el cual el esmalte permanece por debajo del umbral de desmineralización es mayor (Figura I3).



**Figura I3.** Cambios de pH en placa interdental de dos, tres, cinco y seis días de formación, en un voluntario sano de 62 años, después de un enjuague durante dos minutos con una solución de sacarosa al 10%. Se realizó una masticación de parafina antes y después del experimento. Adaptado de (Imfeld and Lutz, 1980).

Estos procesos de desmineralización y remineralización ocurren continuamente en condiciones saludables. La caries dental se inicia cuando estos ciclos de desmineralización-remineralización se descompensan y aumenta el proceso de desmineralización, dándose una pérdida neta de mineral (Figura I4).

La caries dental inicialmente cursa asintóticamente a nivel macroscópico, aunque ocurran algunos cambios a nivel microscópico. La superficie del esmalte comienza a disolverse y se incrementa la porosidad del esmalte (Holmen *et al.*, 1985), de tal forma que se facilita la entrada de los ácidos a la sub-superficie del esmalte, cuya concentración de fluorapatita es menor, haciéndola más susceptible a la desmineralización ácida. Cabe resaltar que la presencia de proteínas ricas en prolina y estaterinas en la película adquirida del esmalte, así como el calcio, iones fluoruro y compuestos tampón de la saliva, evitan una continua disolución de la superficie del esmalte (Aoba, Moreno and Hay, 1984).



**Figura I4. Circuito de retroalimentación positiva que conduce a la caries.** En este ciclo el consumo de carbohidratos es el impulsor de la enfermedad, que puede causar un cambio en la placa dental hacia una microbiota cariogénica. Los mecanismos de mantenimiento de la salud que podrían prevenir algunas de las etapas del ciclo se enumeran en los recuadros verdes. Es probable que algunos de estos mecanismos contribuyan a la resiliencia y mejoren en las personas que son más tolerantes al consumo de carbohidratos (tomado de Rosier, Marsh and Mira, 2017).

La lesión avanza por debajo de una delgada y normalmente mineralizada capa de esmalte. La presencia de esta capa externa de esmalte impide la colonización bacteriana en su interior. Por tanto, la lesión en este punto es producida por la difusión de los ácidos generados por la placa dental y la capacidad de difusión de los iones fuera del esmalte. Cuando los poros del esmalte son lo suficientemente

grandes y profundos, pueden ser detectados clínicamente como “lesiones de mancha blanca”, visibles al secado con aire tanto al principio de la lesión como en etapas posteriores. La progresión sigue una dirección perpendicular desde la superficie (Ekstrand *et al.*, 1998), continuando por los poros de la estructura del esmalte que están bajo la placa acidogénica, hasta que el proceso de desmineralización llega a la unión dentina-esmalte (Bjorndal, Darvann and Lussi, 1999). Esto explica en parte la forma típica de doble cono observada radiográficamente en lesiones de caries de dentina.

Cuando se produce la colonización bacteriana de la dentina, el crecimiento bacteriano es mucho más rápido que en el esmalte, ya que el grado de mineralización es menor. La dentina tiene componentes celulares que son capaces de reaccionar a la difusión de ácido a través de los poros del esmalte, principalmente mediante la adición de minerales en los túbulos de la dentina, ocluyéndolas con el fin de evitar mayores daños y la colonización bacteriana (Stanley *et al.*, 1983). Cuando la dentina que soporta el esmalte se vuelve blanda debido a la pérdida de mineral, la superficie del esmalte puede descomponerse y la barrera de la placa dental desaparece. En este punto, los signos de enfermedad se desarrollan más rápidamente, a medida que avanza el crecimiento bacteriano dentro del diente, facilitando la difusión de ácido. Además, los microorganismos producen colagenasas que, unidas a la actividad de las metaloproteinasas humanas, degradan el colágeno, principal componente proteico del tejido dentinario (Simón-Soro *et al.*, 2013).

Cuando el frente de desmineralización está cerca de la pulpa dental, en la unión dentina-pulpa se forma la dentina terciaria o reactiva, como un intento por detener la enfermedad. Esta dentina reactiva se forma cuando se aplica un estímulo traumático, llegando hasta la cámara pulpar. Los odontoblastos comienzan a depositar tejido dentinario hacia la cámara de la pulpa y si el trauma es lo suficientemente fuerte, la disposición de los túbulos dentinarios se vuelve

irregular en comparación con la dentina primaria y secundaria (Klinge, 2001). Si los estímulos se prolongan en el tiempo, la cámara pulpar puede ser sustituida totalmente, ya que la continua formación de dentina terciaria ocupa toda la cámara pulpar, impidiendo el avance de los microorganismos.

## 1.2 Etiología de la caries dental

La etiología de la caries dental es compleja ya que generalmente se atribuye a múltiples factores indirectos como la dieta, la forma de los dientes, la capacidad tampón de la saliva, o la higiene bucodental, entre otros. Numerosas referencias incluyen diversas teorías sobre el origen de la caries, y en la actualidad existen varias hipótesis recopiladas a través del tiempo por años de investigación y observación, algunas de las cuales son la teoría ácidogénica, la químico-parasitaria, la proteolítica, la de la placa específica, la de la placa no específica y la hipótesis del patógeno angular o clave.

La teoría ácidogénica, que surgió en el año 1820, se basaba en que la caries dental afectaba externamente al diente, no internamente, y por consiguiente el responsable de la misma debía ser un agente químico hasta ese momento no identificado. En el año 1835 Robertson postula que la caries dental es producida por el ácido formado por la fermentación de partículas de comida que se encuentran alrededor del diente (Robertson, 1842).

La teoría parasitaria es la primera que relaciona los microorganismos con la caries dental. En el año 1843 Erdl describe organismos filamentosos en la "superficie membranosa" de los dientes. Estos microorganismos fueron denominados *denticolae*, derivados de cavidades cariosas. El concepto parasitario de la caries fue diseminado por los físicos alemanes Leber y Rottenstein, quienes expresaron el concepto de caries dental como un proceso inicialmente químico pero que gracias a la acción de microorganismos continuaba con la desintegración del esmalte y la dentina (Leber and Rottenstein, 1878).

Adicionalmente a estas observaciones, entre los años 1871 y 1878, Clark, Tomes y Magitot coincidieron en que las bacterias eran esenciales para la formación de la caries, y además sugerían que la producción de ácidos era debida a una fuente exógena (Clark, 1871; Tomes and Tomes, 1897; Magitot, 1878). En 1880 Underwood y Milles presentaron una teoría que se basaba en la creencia de que el ácido capaz de causar la descalcificación del diente era producido por una bacteria que se alimentaba de las fibrillas orgánicas de la dentina. Ellos además reportaron que al observar microscópicamente secciones de dentina careada se podían observar micrococos y microorganismos con formas ovaladas y bacilares (Underwood and Milles, 1881). Posteriormente, Miller propuso que la caries era un proceso químico-parasitario que consistía inicialmente en la descalcificación del esmalte hasta llegar a su total destrucción con el subsecuente deterioro de la dentina, y que el ácido que producía la descalcificación primaria era derivado de la fermentación de los almidones y azúcares almacenados en los espacios interdentes. Pero la teoría de Miller no era suficiente para explicar conceptos como el del predominio de la aparición de caries dental en sitios específicos del diente, poblaciones sin problemas de caries o fenómenos de caries no activas. En cuanto al rol que tenían los microorganismos en el desarrollo de la caries dental, Miller demostró la presencia de cocos y “leptothrix” en los túbulos de dientes cariados y sentó las bases para determinar la importancia de los ácidos elaborados por bacterias en la producción de la caries. En el año 1900 Goadby aisló bacilos Gram positivos de dentina cariada y los denominó *Bacillus necrodentalis*, sugiriendo que participaban en la descalcificación del esmalte y la dentina (Goadby, 1900). Más tarde cambiaron sus apreciaciones y propuso que eran especies de estreptococos los causantes de la caries dental (Sivapathasundharam B *et al.*, 2009).

McIntosh, James y Lazarus-Barlow estaban interesados en identificar los microorganismos capaces de disminuir el pH de forma tal que el esmalte dental

perdiera su dureza característica. Partiendo de muestras de dentina cariada aislaron una bacteria que denominaron *Bacillus acidophilus odontolyticus*. Por la misma época Clarke, en Gran Bretaña, aisló estreptococos de dientes que presentaban estadios tempranos de caries. En el año 1.924 describió una nueva especie de estreptococo al que denominó *Streptococcus mutans*, aislado a partir de muestras de pacientes británicos con caries dental (Clarke, 1924). Su trabajo fue confirmado tres años después por MacLean (MacLean, 1927) y así fue como el interés científico por *S. mutans* emergió, continuando hasta nuestros días.

Muchos de los investigadores iniciales focalizaron su atención en *Lactobacillus acidophilus* puesto que fue encontrado con frecuencia en personas susceptibles de padecer caries, y llegó a ser considerado de gran importancia en la etiología de la misma. En 1.925 Bunting y Palmerlee reportaron formas bacilares en todas las lesiones iniciales de caries similares a las descritas por McIntosh y las nombraron *Bacillus acidophilus*. Russel Bunting describió la caries dental como una enfermedad infecciosa producida por *Bacillus acidophilus* al que años más tarde se denominó *Lactobacillus acidophilus*, siendo éste hoy en día un factor etiológico específico responsable de las etapas tardías de la patología (Shah *et al.*, 2011). En el año 1.928 Bunting declaró que la presencia o ausencia de *B. acidophilus* en la boca constituía un criterio definitivo de actividad de la caries dental y era más preciso que cualquier estimación clínica (Bunting, 1928). Además, su grupo de trabajo observó que había un cese espontáneo en la formación de caries que coincidía con la desaparición de *B. acidophilus* en la boca de pacientes sometidos a un control dietético, profiláctico o a tratamiento. Bunting, Nickerson y Hard realizaron numerosos estudios con estos microorganismos y reportaron que estaban ausentes en bocas de personas sin caries, pero usualmente presentes en bocas de personas susceptibles a padecer caries (Bunting, Nickerson and Hard, 1927). Resultados similares se reportaron por Jay y Voorhees, quienes encontraron que la presencia de *L. acidophilus* en

personas sin caries activas constituía un presagio del desarrollo de dientes cariados varios meses después (Jay and Voorhees, 1927). Entre este periodo y el año 1.940 se realizaron numerosos estudios para confirmar o determinar la existencia de un microorganismo responsable de la caries dental.

En 1.945 Keyes demostró que bajo ciertas condiciones de laboratorio la caries dental en hámsters y ratas podría ser considerada una enfermedad infecciosa y transmisible, sujeta a los principios biológicos que rigen cualquier proceso infeccioso (Keyes, 1945). Fitzgerald y Keyes demostraron que en hámsters con caries inactivas donde predominaban microorganismos no cariogénicos, tras la inoculación vía oral de ciertas cepas de estreptococos aislados de hámsters con caries, se lograba inducir la típica lesión de caries dental activa (Fitzgerald and Keyes, 1960). A partir de estos resultados se planteó la importancia que tenían los estreptococos en la etiología de la caries dental y fue fundamental para sustentar la teoría específica de la placa, al mostrar que bacterias concretas podían ser capaces de inducir las lesiones de caries.

En los últimos años diferentes estudios microbiológicos han permitido por fin determinar el rol de algunos microorganismos en la etiología de la caries dental. Se ha profundizado en la relación que puedan tener los hábitos alimenticios con las bacterias orales y en si esta asociación puede estar involucrada en el desarrollo de lesiones en diferentes superficies del diente. La evidencia científica permitió afirmar que las diferentes interacciones entre las bacterias y la dieta pueden producir caries en la superficie de la raíz y la corona del diente, siendo estas dos enfermedades diferentes desde el punto ecológico y microbiológico (Nyvad and Fejerskov, 1987). Por otro lado, han sido analizados tanto microorganismos específicos como combinaciones de algunas especies incluyendo *Lactobacillus*, *S. mutans* y algunas especies de *Actinomyces*, que sin duda alguna son bacterias asociadas a la producción de caries (Aparna, Hegde and

Shetty, 2013; Chokshi *et al.*, 2016) Trabajos más recientes han relacionado claramente *Bifidobacterium* con la caries dental en adultos (Mantzourani *et al.*, 2009) y *Scardovia wiggsiae* como un importante agente etiológico en caries temprana en niños (Tanner *et al.*, 2011).

En la actualidad se sabe que los estreptococos estudiados por Keyes y Fitzgerald eran cepas de *Streptococcus mutans*, un eficiente microorganismo cariogénico con distribución geográfica global pero con una particular prevalencia en sociedades donde el consumo de sacarosa es elevado. Tras años de investigaciones, se pudo establecer que varios microorganismos son capaces de inducir lesiones de caries cuando son utilizados como únicos contaminantes en ratas gnotobióticas. Éstos incluyen a los estreptococos del grupo viridans, como las cepas de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* (diferentes cepas), *Peptostreptococcus intermedius*, así como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces viscosus* y *Actinomyces naeslundii* (Burckhardt and Guggenheim, 1980; Drucker, Fitzgerald and Green, 1981; Drucker, Shakespeare and Green, 1984; van der Hoeven *et al.*, 1974; Willcox, Drucker and Green, 1987). Además, en los modelos estudiados varios estreptococos y lactobacilos como *Lactobacillus fermentum* y *Streptococcus lactis* no producían caries, lo que sugiere que no todos los microorganismos presentes en la cavidad oral son cariogénicos. Esta idea de los organismos orales asociados a salud se ha reforzado en la última década (ver Zaura *et al.*, 2009; Alcaraz *et al.*, 2012). Asimismo, se observó que los microorganismos implicados en la patología muestran cierta selectividad por la superficie del diente donde actúan. Algunas especies son las encargadas de iniciar las fisuras cariosas y colonizar estas áreas; sólo un número limitado de bacterias colonizan las superficies lisas, como *S. mutans*, y por ello algunos de los microorganismos involucrados en la caries de raíz son diferentes a las de superficie lisa.

Aunque durante años se postularan diferentes teorías sobre la etiología de la caries dental, generalmente se han aceptado tres hipótesis principales: i) la

hipótesis de la placa específica (Loesche, 1992) ii) la hipótesis de la placa no específica, (Theilade, 1986) y iii) la hipótesis de la placa ecológica (Marsh, 1994; Takahashi and Nyvad, 2010).

La hipótesis de la placa específica establece que de la comunidad bacteriana de la placa supragingival, solamente un número limitado de géneros bacterianos son los responsables de la producción de ácido y por lo tanto, son los agentes causantes de la enfermedad (también denominados odontopatógenos, Loesche, 1986). La primera bacteria asociada a la caries dental fue *S. mutans* (Clarke, 1924), Clarke reprodujo en sus experimentos caries *ex-vivo*, sumergiendo piezas dentales extraídas en cultivos de *S. mutans*, lo que demostró que este microorganismo podría colonizar incluso los túbulos de la dentina. Más tarde se propusieron otras especies asociadas a la producción de caries, como *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* y *Actinomyces odontolyticus*.

La hipótesis de la placa específica se basaba en cuatro puntos fundamentales: 1. las especies bacterianas mencionadas anteriormente eran aisladas frecuentemente de lesiones de caries cavitadas; 2. estas bacterias inducían la formación de caries en animales cuando se alimentan con una dieta rica en sacarosa; 3. son microorganismos muy acidogénicos y acidúricos; y 4. estas bacterias suelen ser capaces de producir glucano insoluble en agua, que promueve la adhesión bacteriana sobre la superficie del diente y de otras bacterias.

Por otro lado, la hipótesis de la placa no específica se plantea desde siglos atrás gracias a investigaciones realizadas como las de Willoughby D. Miller, alumno de Koch. Éste, al observar que la caries era causada principalmente por la desmineralización ácida, aisló 23 cepas bacterianas y estudió su capacidad para producir ácido y álcali. Encontrando que todas las cepas eran capaces de acidificar el medio de cultivo cuando se añadía azúcar o almidón y que

alcalinizaban cuando se añadía extracto de carne o sustancias de origen albuminoide (Miller, 1890). Por tanto, postulaba que la caries pudiera ser causada por el efecto combinado de la producción de ácido de toda la microbiota y no por una sola especie bacteriana. Además, se refirió a la caries como una enfermedad de dos etapas, donde las bacterias productoras de ácido desmineralizan el esmalte y la dentina subyacente. Y una vez disuelto el esmalte y expuesta la dentina reblandecida, las bacterias con capacidad para degradar las proteínas eran capaces de degradar el tejido dentario, lo cual ha sido confirmado recientemente por estudios metagenómicos (Simón-Soro *et al.*, 2013). Miller también demostró que cuando se administraba azúcar o almidón-goma, el pH de las muestras de saliva y placa era ácido y podía reproducir artificialmente el proceso de la caries. Asimismo, observó que las muestras de saliva incubadas con sustancias albuminoideas, como extractos de carne, no producían ácido láctico y su pH estaba en el rango neutro.

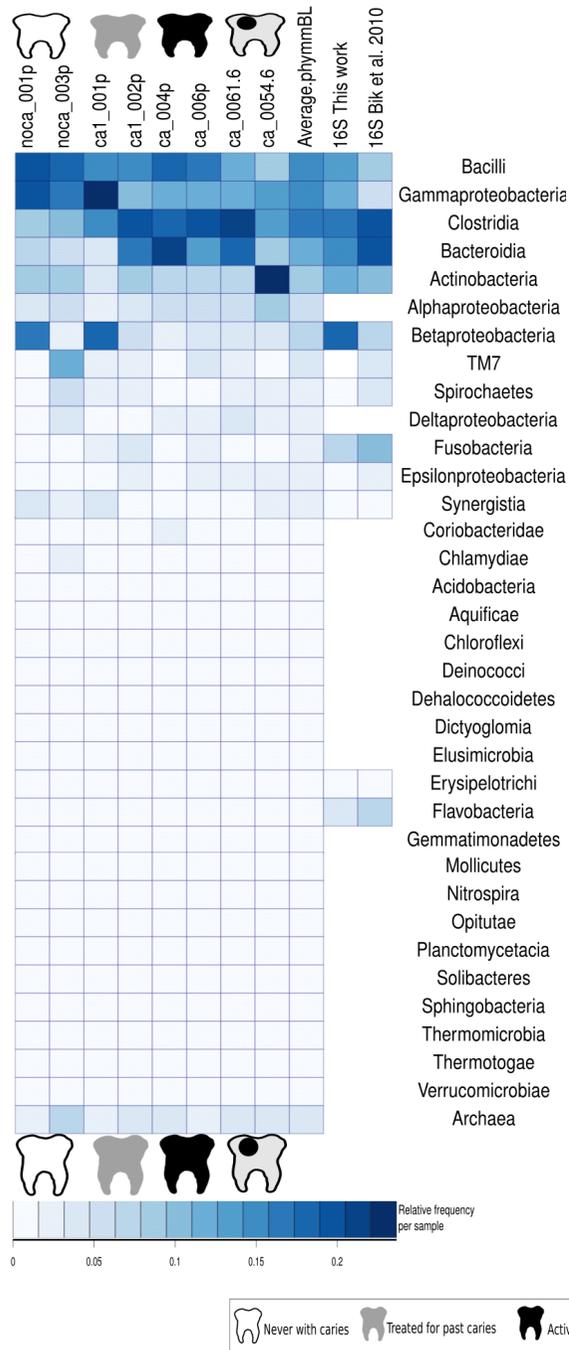
Otros autores han propuesto que las enfermedades orales no son producto de una especie bacteriana única, ni tampoco de un conjunto característico de especies, sino que por el contrario la caries puede ser causada por diferentes combinaciones de especies bacterianas (Theilade, 1986). Por lo tanto, la clásica teoría del mono-agente etiológico, propuesta en los postulados de Koch, no puede ser avalada por estas observaciones (Simón-Soro and Mira, 2015). La caries, por tanto, se define como resultado de la actividad global de parte o toda la microbiota de la placa, que se compone de muchas especies bacterianas (Becker *et al.*, 2002).

En apoyo de estas hipótesis, con el uso de técnicas moleculares como la clonación del gen ribosómico 16S amplificado por PCR, se ha constatado en un porcentaje bastante elevado de muestras de caries la ausencia de *S. mutans* y la presencia de otras bacterias productoras de ácido que podrían ser cariogénicas,

tales como *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Selenomonas* o *Bifidobacterium* (Gross *et al.*, 2012; Aas *et al.*, 2008). Trabajos más recientes basados en técnicas ómicas han confirmado estos resultados y ampliado la lista de potenciales agentes cariogénicos, incluyendo a especies de los géneros *Veillonella*, *Propionibacterium* y *Atopobium*, (Figura I5), la mayoría de las cuales son especies pobremente caracterizadas (Belda-Ferre *et al.*, 2012; Simón-Soro *et al.*, 2013; Simón-Soro, Guillen-Navarro and Mira, 2014).

Las consecuencias terapéuticas derivadas de esta teoría se basan principalmente en la privación de la ingesta de azúcares fermentables y la eliminación continua de la biopelícula dental, ya que la biomasa de biopelícula está correlacionada con la producción de ácido en presencia de azúcares de la dieta (Figura I3). Recientemente, simulaciones informáticas de la placa dental basadas en datos reales de crecimiento de diversas especies bacterianas y de cinética de las enzimas involucradas en la producción de ácido confirman la importancia de los niveles de azúcares en la dieta y de la frecuencia con la que se ingieren (Marsh, Head and Devine, 2015a).

Por otro lado, la hipótesis de la placa ecológica sugiere que la caries es el resultado de un cambio en el equilibrio de la microbiota residente, impulsado por los cambios en las condiciones ambientales locales (Marsh, 2003). Las principales características de esta hipótesis son que la selección de las bacterias patógenas se acopla directamente a los cambios en el medio ambiente, y las enfermedades no necesitan tener una etiología específica; cualquier especie con rasgos relevantes pueden contribuir al proceso de la enfermedad. Por lo tanto, los estreptococos del grupo mutans son unos de los organismos mejor adaptados al ambiente cariogénico (azúcar /pH bajo), pero estos rasgos no son únicos de estas bacterias, y géneros como *Lactobacillus* o *Veillonella* que comparten algunas de estas propiedades y podrían contribuir a la desmineralización del esmalte (Takahashi and Nyvad, 2008).



**Figura I5. Diversidad bacteriana en la cavidad oral.** Se observan las frecuencias relativas para diferentes tipos de caries y clases bacterianas, basadas en la asignación de lecturas de genes funcionales y ribosómicos de un metagenoma, y comparadas con los resultados de PCR obtenidos por Bik *et al* (2010). Adaptado de Belda-Ferre *et al.*, 2011.

Por último, la hipótesis del patógeno angular o patógeno clave se ha extrapolado del ámbito arquitectónico, para así denominar en literatura ecológica a las especies que tienen un efecto desproporcionado en un nicho ecológico (Rosier *et al.*, 2014), independientemente de su abundancia total en ese ambiente (Paine, 1969; Power *et al.*, 1996; Darveau, Hajishengallis, and Curtis, 2012). Esta teoría plantea que algunos patógenos con baja abundancia puedan favorecer el aumento de la microbiota normal y cambiar su composición (Hajishengallis, Darveau and Curtis, 2012). A diferencia de las especies dominantes, que pueden causar patología por su alta abundancia en el nicho, el patógeno angular podría desencadenar procesos disbióticos (alteración del equilibrio ecológico) estando presente en baja proporción. Ello facilitaría no solamente su propia supervivencia y multiplicación, sino también la de toda la comunidad microbiana.

Esta hipótesis se propuso para *Porphyromonas gingivalis* y su papel en la periodontitis, una enfermedad oral inflamatoria polimicrobiana y con repercusiones sistémicas asociadas. En el trabajo Hajishengallis G *et al.*, 2011 se demostró que, a niveles de colonización muy bajos, esta bacteria lograba provocar cambios en la cantidad y composición de la microbiota oral, promoviendo la inflamación y pérdida de hueso alveolar. Ello indicaría que una sola especie con baja abundancia puede alterar la homeostasis microbiana del huésped, causando una enfermedad inflamatoria. Pero si bien la hipótesis del patógeno angular ha recibido un robusto apoyo experimental en modelos animales en el caso de la periodontitis (Socransky, 1977; Hajishengallis and Lamont, 2012; Abusleme *et al.*, 2013), la existencia de un patógeno clave en el caso de la caries no ha sido postulada, y el estudio comparado de la microbiología de la caries y la periodontitis sugiere que esta hipótesis puede no ser aplicable al caso de la caries (Mira, Simón-Soro and Curtis, 2017).

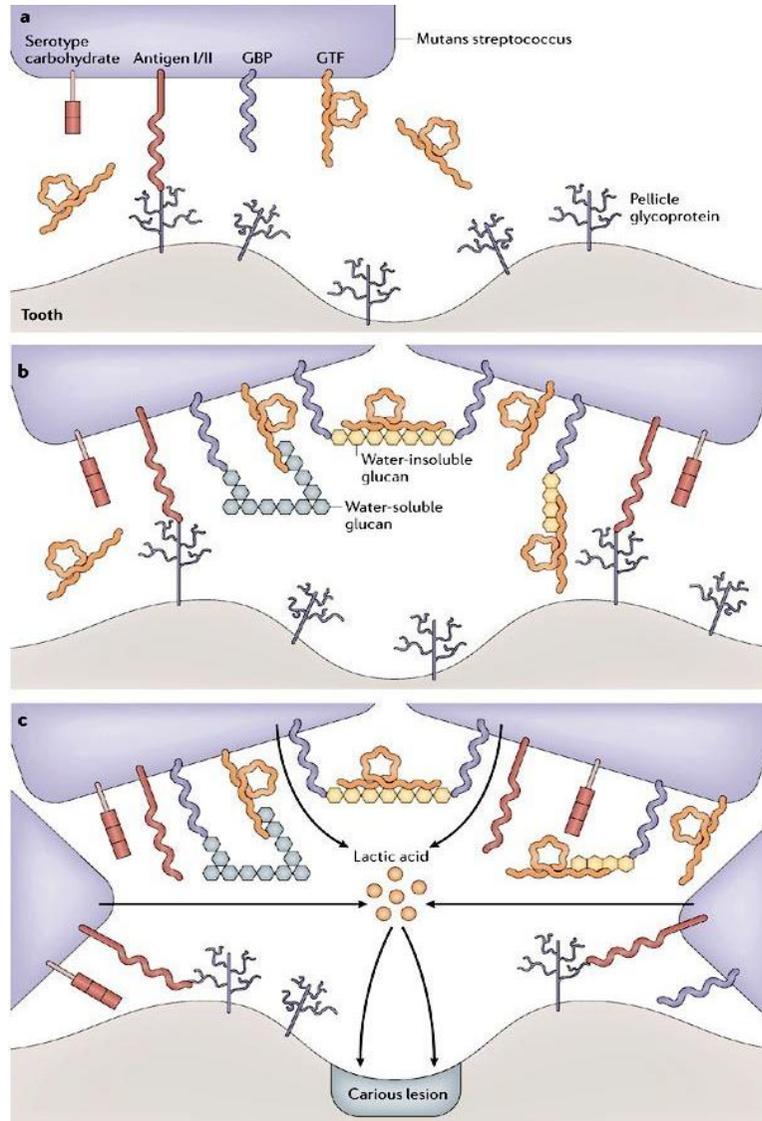
### 1.3 Importancia de las bacterias ácidogénicas

La teoría de la placa no específica contempla que la causa de la caries dental es la acción conjunta de toda la microbiota presente en la placa, pero no existe duda alguna de que *S. mutans* es uno de los microorganismos que contribuye a la acidificación de la placa y por tanto, a su desmineralización. *Streptococcus mutans* es una de las especies más estudiadas en la cavidad oral, y un gran número de estrategias terapéuticas encaminadas a la salud oral, desde el diagnóstico de individuos de riesgo a el desarrollo de una vacuna contra la caries, han sido dirigidas frente a esta especie. *S. mutans* se caracteriza por ser un coco Gram positivo, agrupado en cadenas cortas o medianas, es catalasa negativo y forma colonias convexas en agar mitis salivarius. Además, es capaz de sintetizar polisacáridos insolubles a partir de la sacarosa, es homofermentativo y es más acidúrico que cualquier otro estreptococo. Las cepas cariogénicas de *S. mutans* contienen un bacteriófago lisogénico, que puede ser inducido por luz ultravioleta, mitomicina C (MC), nitrosoguanidina (NG) o estreptomycin. La presencia de este fago lisogénico se asocia directamente a la adhesión natural de las células de *S. mutans* en presencia de sacarosa (Higuchi, Higuchi and Katayose, 1982). En cepas no cariogénicas se ha observado que la ausencia de este profago se correlaciona con su deficiente habilidad para formar polisacáridos insolubles y la incapacidad de adherirse a superficies como el vidrio.

El substrato más importante que involucra a *S. mutans* en el proceso de formación de la caries es el disacárido sacarosa. Existen diferentes vías por las que *S. mutans* puede asimilar la sacarosa, como por ejemplo la conversión de la sacarosa a polímeros extracelulares adhesivos por medio de uniones celulares y enzimas extracelulares. Mucha de la sacarosa metabolizada por *S. mutans* es utilizada para suplir sus requerimientos energéticos, generando así la producción de ácido láctico. La habilidad de *S. mutans* para formar placas adhesivas puede explicarse por su dependencia específica a la sacarosa y no a otros carbohidratos

que forman parte de la dieta (Bowen and Koo, 2011; Zeng and Burne, 2012). *Streptococcus mutans* polimeriza la glucosa y la fructosa, y las fracciones de sacarosa son usadas para sintetizar glucanos y fructanos, que son dos tipos de polímeros extracelulares. Los glucanos son los más significativos ya que promueven la acumulación de *S.mutans* en el diente. Dos homopolímeros de glucano, llamados dextrano y mutano son también sintetizados; el mutano es un constituyente importante de la matriz fibrilar que se encuentra en la placa dental, es menos soluble y más resistente al ataque enzimático en comparación con el dextrano (Leme *et al.*, 2006; Koo *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2015). El ácido lipoteicoico es otro polímero extracelular que se encuentra en cultivos de *S.mutans*, está cargado negativamente y contribuye fuertemente a la adherencia de la bacteria. Además, las cepas tienen la habilidad de almacenar glucógeno intracelular similar al polisacárido amilopectina, que provee un reservorio de sustrato por periodos prolongados de tiempo permitiendo un incremento en la actividad metabólica (Hogg, Whiley and De Soet, 1997; Castillo Pedraza *et al.*, 2017).

La Figura I6 representa esquemáticamente el proceso de formación de biopelículas en las superficies dentales mediada por la participación activa de *S. mutans*. Estas biopelículas se forman gracias a la acción de varios componentes como la sacarosa, que permite la acumulación de los estreptococos, además de enzimas glicosiltransferasas (GTFs) que son sintetizadas por todos los estreptococos del grupo mutans, y proteínas fijadoras de glucanos (GBPs).



**Figura I6. Proceso de formación de la placa dental cariogénica.** a) Se cree que la fijación inicial de *S.mutans* a la superficie de los dientes es el primer evento de formación de la placa dental. La adhesina producida por esta especie (antígeno I/II), interacciona con galactósidos, componentes derivados de las glicoproteínas en la saliva de la película dental. Otros receptores en la superficie de *S.mutans* incluyen a la proteína de unión a glucano, serotipos de hidratos de carbono y GTFs, b) en presencia de sacarosa los GTFs sintetizan glucanos extracelulares a partir de glucosa. Tanto GBP (como GTF permiten la unión de glucanos, c) el metabolismo de diversos sacáridos debido a la acumulación de biopelículas bacterianas influye en la producción y secreción de cantidades considerables de ácido láctico como producto final del metabolismo. Éste puede causar la desmineralización de la estructura de los dientes cuando está presente en cantidades suficientes y en estrecha proximidad a la superficie del diente (Tomado de Taubman and Nash, 2006).

#### 1.4 Tratamiento de la caries dental y estrategias preventivas

El tratamiento de la caries se puede abordar desde múltiples enfoques. Si se parte desde el punto de vista médico consistiría en eliminar el agente infeccioso y los tejidos dentales afectados y en la restauración o rehabilitación del diente, incluyendo en este caso el uso de obturaciones, coronas o tratamiento de conductos, considerando susceptibles de tratamiento quirúrgico o restaurador las lesiones que han logrado penetrar más allá del tercio exterior de la dentina. En las obturaciones se procede a eliminar inicialmente el material cariado reemplazándolo con aleaciones de oro, plata, porcelana o resina compuesta. Cuanto más tarde reciba un diente una obturación, más tarde se incorporará al ciclo de retratamiento y, por lo tanto, mejor será su pronóstico de vida. Es por esta razón que se deben potenciar todos los factores remineralizantes, y solo cuando una lesión es activa y se comprueba su progresión en dentina, debe ser obturada.

En el año 2015, solo se habían secuenciado dos fagos de *S.mutans*, el M102 (van ver Ploeg, 2007) y el M102AD (Delisle *et al.*, 2012). El M102 fue aislado en Francia por Armau E y sus colaboradores, en el año 1988 (Armau *et al.*, 1988). Mientras que el M102AD, procedía de un lote de M102 almacenado en la Universidad de Maryland, que resultó ser genéticamente diferente del fago M102 original, tras comparar sus genomas. Otros dos fagos de *S.mutans* también fueron caracterizados parcialmente en la Universidad de Maryland, los fagos e10 y f1 (Delisle and Rostkowski, 1993). La poca información acerca de los fagos en *S. mutans*, es probablemente debida a la dificultad de aislar fagos de muestras obtenidas de la cavidad oral. En dos estudios realizados por (Bachrach *et al.*, 2003) y (Hitch, Pratten and Taylor, 2004), con el objeto de aislar fagos contra patógenos orales, no se lograron aislar fagos contra *S.mutans*.

En el estudio de (Dalmaso M *et al.*, 2015), en la Universidad de Cork (Irlanda), sólo lograron aislar un fago denominado  $\phi$ APCM01, tras un cribado en 85 muestras de saliva, evaluando la capacidad del fago para inhibir el crecimiento de *S. mutans* y la formación de biopelícula. El  $\phi$ APCM01 demostró ser altamente lítico contra la cepa de *S. mutans* DPC6143. Además, mostró una carencia de habilidades lisogénicas. Estos criterios hacen que el fago  $\phi$ APCM01 sea un candidato adecuado para la terapia con fagos, ya que reduce eficazmente el crecimiento de *S. mutans*, en al menos 5 log UFC/ml en caldo de cultivo en el laboratorio y por lo menos 3 log UFC/ml en saliva artificial suplementada con sacarosa.

En la cavidad oral, *S. mutans* no suele colonizar las bocas de niños antes de la erupción dental, aunque estudios recientes han detectado su presencia a los pocos meses de vida, en ausencia de tejidos duros (ver, por ejemplo, Dzidic *et al.*, 2018). Sin embargo, el hallazgo de este tipo de estreptococos se ve fuertemente influenciado por factores como el aumento de la ingesta de azúcares en la dieta de los niños y la transmisión vertical de *S. mutans* por contacto directo con la saliva de la madre o de otros individuos cercanos que tengan el microorganismo en su boca, dado que en condiciones normales la cepa no se encuentra libre en la naturaleza (Wan *et al.*, 2001)

Para los tratamientos preventivos, que pretenden reducir la incidencia, prevalencia y gravedad de las lesiones por caries dental, se han venido usando productos, sustancias y medicamentos de acción preventiva tales como el flúor, la clorhexidina, el xilitol, agentes remineralizadores. Como se ha comentado anteriormente, el flúor aumenta la resistencia del esmalte al formarse fluoroapatita a partir de la hidroxiapatita, y también inhibe la producción de ácido proveniente de microorganismos fermentadores, incrementando la remineralización. La clorhexidina, que es un antimicrobiano catiónico de amplio

espectro cuya acción está dada por la reducción de la formación de la película adquirida y de la adhesión microbiana a la superficie dental, previene la transmisión de microorganismos cariogénicos (Dasanayake *et al.*, 2002; Autio-Gold, 2008; Walsh, Oliveira-Neto and Moore, 2015). Sin embargo, su acción es indiscriminada y por tanto su uso continuado puede desestabilizar el microbioma oral, rompiendo el equilibrio ecológico. Ello conlleva importantes consecuencias para la salud, que van desde la invasión por hongos patógenos oportunistas al aumento de la tensión sanguínea por una disminución en la producción de óxido nítrico por las bacterias orales, que actúa como vasodilatador (Bondonno *et al.*, 2014). Por tanto, las estrategias antimicrobianas no específicas suelen considerarse actualmente una mala aproximación (Marsh *et al.*, 2015; Mira, 2018).

Por otro lado, el xilitol que es un polialcohol obtenido de forma natural a partir de algunos árboles y frutos, es también un producto intermediario en el ciclo metabólico de la glucosa. Fue autorizado por la FDA (Food and Drug Administration) estadounidense como aditivo alimentario en 1963 y ha sido utilizado ampliamente como sustituto del azúcar desde los años 70, ya que tiene sabor dulce y menos calorías que el azúcar. Sus propiedades para la prevención de la caries se establecieron en el año 1970, gracias a experimentos con modelos animales en Finlandia (Mühlemann, Regolati and Marthaler, 1970), y el primer chicle con xilitol se fabricó en este mismo país en 1975. En estos estudios, se descubrió que el xilitol interrumpe los procesos de producción de energía de *Streptococcus mutans*, lo que conduce a la muerte celular bacteriana, consiguiendo la disminución de los niveles de este microorganismo en placa dental y saliva (Trahan, Néron and Bareil, 1991). Como cualquier otro edulcorante, es usado por *S. mutans*, que lo transporta al interior de la célula y lo convierte en xilitol-5-fosfato a través del sistema fosfoenolpiruvato:fructosa-fosfotransferasa, produciendo vacuolas intracelulares y degradando la membrana

celular (Marttinen *et al.*, 2012). El xilitol-5-fosfato es defosforilado y expulsado de la célula con un coste energético que no es contrarrestado por la energía obtenida de su metabolismo, ralentizando el crecimiento de *S. mutans*. También se ha probado que el xilitol favorece la mineralización, ya que al usarse como chicle o pastilla aumenta el flujo salival. La singularidad del xilitol es que es prácticamente no fermentable por las bacterias orales. Además, su consumo prolongado da lugar a la aparición de cepas de *S. mutans* con capacidad reducida de adhesión al diente y de producir ácido, disminuyendo su capacidad de desmineralización.

La disminución de la caries debida al xilitol se ha abordado en numerosos estudios con seguimientos de 12 a 40 meses. Una revisión sistemática y metaanálisis resume la eficacia del xilitol, dando un resultado en forma de fracción prevenida (FP) del 58,66% (Deshpande and Jadad, 2008). También hay estudios que describen beneficios a largo plazo, con disminución de la caries incluso 5 años después de la interrupción de un tratamiento preventivo con xilitol (2 años de duración). Además, también se ha demostrado una mayor eficacia en los dientes que están en erupción e incluso que la administración de xilitol en las madres pueda reducir la adquisición de *S. mutans* y caries en sus hijos (Söderling *et al.*, 2001; Maternal xylitol to prevent childhood caries, 2014). Así mismo, se ha demostrado que bajo condiciones anaeróbicas, la producción de ácido mediante el metabolismo de la glucosa es inhibido por el xilitol. Además, hace que *S. mutans* disminuya la producción de lactato y aumente la de formato y acetato (Miyasawa *et al.*, 2003).

Los efectos secundarios encontrados están relacionados con diarrea osmótica, que se ha descrito en individuos que consumen entre 3 y 60 gramos diarios. Esto es debido a que los alcoholes dulces, como el xilitol, se absorben solo parcialmente en el intestino. El xilitol se puede encontrar en varias formas,

como chicles, enjuagues, pasta dental, caramelos blandos, etc., pero el producto más estudiado en su acción preventiva de la caries es el chicle.

El proceso de remineralización está indicado para el tratamiento de caries de esmalte sin cavitación y se utilizan soluciones o geles remineralizantes a base de calcio, fosfatos y flúor, flúor tópico, xylitol o xylitol más flúor y flúor tópico, más aplicación de terapia láser (Kachue and Khoroushi, 2017). Agentes como el nitrato de plata, el nitrato de plata amoniacal, el fluoruro de estaño y el fluoruro diamino de plata también han sido utilizados como posibles cariostáticos, inhibiendo la progresión de la caries, disminuyendo la sensibilidad dental y remineralizando la dentina cariada (Zhi, Lo and Kwok, 2013; Mei *et al.*, 2013; Horst, 2018). En algunas investigaciones se han utilizado resinas compuestas que liberan flúor para medir su acción cariostática, pero en ninguna de ellas estos compuestos han presentado el potencial cariostático esperado. La utilización de rayos laser puede ayudar a aumentar la resistencia del esmalte frente al avance del proceso de la caries (El Assal *et al.*, 2018).

La inmunización contra la caries dental busca atacar los factores involucrados en la adhesión y acumulación bacteriana. Entre estos factores se encuentran la proteína Pac (también denominada antígeno I/II, B, IF, P1, MSL-1) que forma parte de la pared celular de *Streptococcus mutans*, posee un carácter antigénico y se asocia a los fenómenos iniciales de adherencia y agregación del microorganismo sobre la superficie dental, tomando como sustrato las proteínas de la película adquirida, las glucosiltransferasas (GTFS) y las proteínas fijadoras de glucanos (GBPs). Se han planteado diferentes estrategias para el desarrollo de una vacuna para la caries con la que se busca aumentar los niveles de anticuerpos, especialmente de tipo IgA e IgG, tanto en saliva como en suero, en un proceso comandado por la inmunidad adquirida celular mediada por los linfocitos T. Para ello, se han hecho intentos de lograr una inmunización activa utilizando proteínas completas independientes, combinaciones de porciones de proteínas y

péptidos sintéticos; éstos son reconocidos por los linfocitos T y B en modelos animales con ratas gnotobióticas y monos (Abiko, 2000). Sin embargo, aunque en la mayoría de los trabajos se reportan resultados que muestran una disminución significativa de la colonización y actividad enzimática de *Streptococcus mutans*, no se han alcanzado hasta ahora niveles protectores de anticuerpos que permitan hablar de una vacuna desarrollada contra la enfermedad. También existen aproximaciones de inmunización pasiva en las que los anticuerpos contra antígenos de superficie de *S. mutans* son sintetizados en el laboratorio e inoculados directamente sobre la superficie dental, proporcionando protección contra esta bacteria durante unas horas (Ma J *et al.*, 1989). En general, la espectacular naturaleza polimicrobiana de la caries, así como su alta variabilidad entre caries de distintos individuos e incluso entre caries de la misma persona (ver, por ej. Gross *et al.*, 2012; Simón-Soro *et al.*, 2014) hacen muy difícil la elaboración de una vacuna efectiva (Mira, 2018). Aunque se ha propuesto la selección de genes compartidos entre varias especies patógenas como posibles dianas para estrategias de inmunización (Mira *et al.*, 2004), es improbable que esta estrategia diera resultados debido al alto número de bacterias cariogénicas involucradas en las lesiones (Simón-Soro and Mira, 2015). En el caso de las vacunas actuales, basadas en los antígenos de superficie de *S. mutans*, la baja eficacia es probable que se deba a la ausencia de *S. mutans* en muchas lesiones y a la baja frecuencia de este patógeno en las mismas, donde nunca supera el 1% del total, tal como demuestran los estudios basados en ADN y en ARN (Simón-Soro *et al.*, 2013; Simón-Soro *et al.*, 2014; Simón-Soro and Mira, 2015; Mira, 2018).

Otro tipo de estrategias están basadas en la producción de sustancias alcali por parte de la propia microbiota oral. Por ejemplo, existe evidencia sobre el uso del aminoácido arginina, que al ser metabolizado por las bacterias de la cavidad oral, aumenta el pH y lleva a crear condiciones de sobresaturación de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $(\text{PO}_4)^3$ , por lo que se favorece la remineralización, contribuyendo a disminuir la

aparición de lesiones. Otra actividad microbiana asociada a una mayor capacidad tampón del pH oral es la de la ureasa, enzima que transforma urea en amonio y que está presente en algunas bacterias orales (Dibdin and Dawes, 1997). La producción de amonio puede influir positivamente en el equilibrio remineralización/desmineralización del diente y podría ayudar a prevenir la aparición de microorganismos cariogénicos (Liu, Nascimento and Burne, 2012). Así pues, el efecto protector de la arginina frente a la acidificación de la placa dental es mediado, por un lado mediante la expresión de enzimas ureasas, y por otro lado por medio del sistema arginina deiminasa (de su siglas en inglés ADS), tal y como se muestra en la Figura I7.

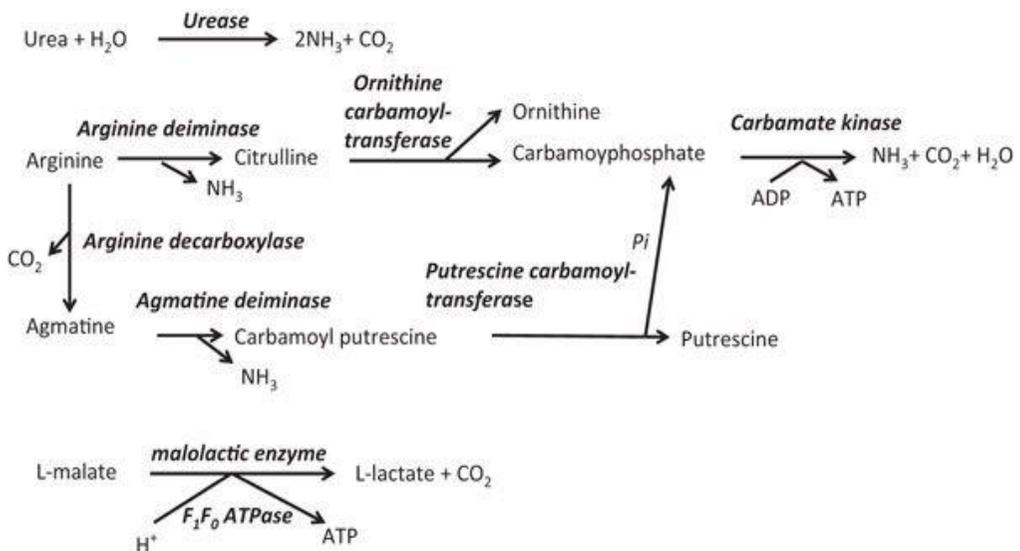


Figura I7. Resumen de vías generadoras de álcali en la cavidad oral.

Tomado de (Liu, Nascimento and Burne, 2012)

Un posible efecto protector se observa en pacientes con insuficiencia renal crónica, en los que la prevalencia de caries dental es poco frecuente, aun cuando sus dietas son ricas en carbohidratos. Estos pacientes curiosamente tienen niveles de urea salival muy altos, encontrándose hasta 50 veces más concentración que en individuos sanos (Epstein, Mandel and Scopp, 1980; Peterson, Woodhead and Crall, 1985; Al Nowaiser *et al.*, 2003).

En el trabajo realizado por Shu M *et al.*, 2007, se midió la actividad ureasa en muestras de placa dental y saliva de sujetos con caries y sin caries. Se evidenció que la actividad de la ureasa en la placa dental de individuos sin caries, era casi tres veces mayor en comparación con los sujetos que tenían caries. En otros estudios se ha podido observar que compuestos comerciales que contienen complejos de carbonato de calcio y bicarbonato de arginina, inhiben el inicio y la progresión de la caries, debido en parte a la capacidad que tienen las bacterias presentes en la placa dental de utilizar como sustrato la arginina para generar amonio (Acevedo *et al.*, 2005, 2008; Nascimento *et al.*, 2009).

La investigación sobre el mecanismo de acción de la arginina se ha centrado principalmente en la capacidad de los estreptococos orales para catabolizar la L-arginina, produciendo amonio y por consiguiente generando un aumento del pH local que contrarresta los efectos perjudiciales del ácido sobre los dientes (Gordan *et al.*, 2010). La evidencia también sugiere que concentraciones micromolares de L-arginina estabilizan metabólicamente a las bacterias dentro de los agregados, y con concentraciones milimolares pueden desagregar coagregados bacterianos y pueden influir en la adherencia de *S. mutans* a la superficie de los dientes (Sharma *et al.*, 2014). La arginina se ha añadido a pastas dentales, y ensayos clínicos realizados en miles de individuos indican que dicha pasta alcaliniza la cavidad oral, disminuye la acidogenicidad de la placa, reduce la tasa de desmineralización del esmalte y reduce el número de caries y su progresión cuando se compara con el uso de una pasta de dientes tradicional que contenga 1500 ppm de flúor (Cantore *et al.*, 2013; Wolff *et al.*, 2013).

Además, dado que las biopelículas son tolerantes a los agentes antimicrobianos, la estrategia de desestabilizar las comunidades bacterianas mediante el uso de la arginina favorecería la susceptibilidad de la biopelícula al ser tratada con antibióticos. Ya que dentro de los mecanismo de acción de la L-arginina se incluye la disminución de la viscosidad de las sustancias extracelulares producidas por las bacterias, la alteración en el metabolismo celular que produce

la dispersión de la biopelícula, junto con una menor tolerancia a los antibióticos, el desequilibrio en la comunicación metabólica entre células, cambios en el pH local, alteración en la señalización célula-célula, entre otros (Kolderman *et al.*, 2015). La actividad arginólítica y ureasa de la microbiota oral ha sido relacionada de forma significativa con una menor incidencia de caries tanto en adultos como en niños (Nascimento *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2014; Moncada *et al.*, 2015). Por este motivo, la arginina se plantea como un importante compuesto de uso preventivo en odontología (Nascimento, 2018). Por supuesto, la aplicación de arginina puede ser suficiente para producir una mejora siempre y cuando la microbiota natural del paciente tenga bacterias arginólíticas, por lo que la identificación, cultivo y estudio de dichas bacterias podría contribuir, y previsiblemente mejorar, el efecto del aminoácido. Por ello, en los últimos años se ha producido un incremento en los esfuerzos para identificar bacterias orales beneficiosas que tengan este tipo de propiedades tamponadoras (Huang *et al.*, 2015, 2016). Las bacterias con propiedades beneficiosas para la salud, cuando se aplican en niveles apropiados, se denominan probióticos y han sido desarrolladas principalmente para su efecto en sistema digestivo, aunque en la última década se está trabajando en la búsqueda y desarrollo de probióticos que mejoren o prevengan las patologías orales (ver, por ejemplo, Mahasneh and Mahasneh 2017).

Otra ruta que podría influir significativamente en la composición del biopelícula oral aunque en menor medida, es el catabolismo de la agmatina. La ruta primaria para la utilización de la agmatina es a través del sistema agmatina deiminasa (AgDS), que es muy similar al ADS, generando como productos finales putrescina, amonio, CO<sub>2</sub> y ATP (ver Figura I7). Aunque se ha estimado que el AgDS, a diferencia del ADS o la ureasa, no produce cantidades suficientes de álcali como para generar un impacto en el pH del biopelícula oral (Liu, Nascimento and Burne, 2012).

## 1.5 Probióticos y su importancia

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador. Esta definición fue propuesta en una consulta mixta de la FAO (Food and Agricultural Organization) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2002, en la que un grupo de expertos elaboró las directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos, así como para identificar y definir qué datos son necesarios para justificar con exactitud las declaraciones de propiedades saludables. Trabajos recientes sobre las propiedades y funcionalidad de los microorganismos vivos en los alimentos sugieren que los probióticos desempeñan un papel importante en las funciones inmunológicas, digestivas y respiratorias, y podrían tener un efecto significativo en el alivio de ciertas enfermedades (He and Shi, 2017; Alok *et al.*, 2017; McFarland, Evans and Goldstein, 2018; Plaza-Díaz *et al.*, 2018). Aunque no se refleje directamente, es importante que los probióticos mantengan activa su capacidad beneficiosa cuando alcanzan sus lugares de acción, su viabilidad durante la vida útil del producto en el que se administran, y debe contener la cantidad de microorganismos suficientes para llevar a cabo su efecto beneficioso. Es necesaria evidencia científica que avale el consumo de un microorganismo determinado como probiótico, produciendo un efecto saludable concreto. Tanto el grupo de expertos de la OMS/FAO (FAO/WHO, 2006), como los de PASSCLAIM (Aggett *et al.*, 2005), coinciden en que la prueba final de eficacia para un probiótico tiene que ser realizada en individuos de la misma especie donde se propone su uso.

Aunque la eficacia real sea demostrable con humanos, no se debe restar importancia a los experimentos de laboratorio y en animales modelo. Según el grupo de la OMS/FAO, inicialmente se debe caracterizar adecuadamente el microorganismo propuesto, incluyendo su identificación por métodos

fenotípicos (características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, ecológicas, etc.), estructurales (membrana citoplasmática, pared celular, cápsula, entre otros) y genotípicos, así como su depósito en colecciones reconocidas internacionalmente. Se requiere una caracterización adecuada y estudios de seguridad en animales, antes de poder ser empleado en humanos.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido identificar diferentes estructuras celulares y moléculas efectoras que son cepa-dependientes y que están relacionadas con las interacciones específicas entre los microorganismos probióticos y las células del hospedador (Kleerebezem and Vaughan, 2009). Existe gran diversidad, en cuanto a mecanismos de acción de las cepas probióticas se refiere. Algunos de ellos incluyen la secreción de proteínas, la producción de metabolitos o péptidos con actividad antimicrobiana como las bacteriocinas, la liberación de enzimas, las proteínas extracelulares y macromoléculas de envoltura microbiana o la estimulación del sistema inmunitario, entre otros (Perdigon *et al.*, 1995; Gillor, Etzion and Riley, 2008; Sanchez, Urdaci and Margolles, 2010; Ashraf and Shah, 2014).

Los microorganismos denominados probióticos, de acuerdo a sus características, pueden ser eficaces sobre una patología u otra. Se ha demostrado, por ejemplo, que *Lactobacillus rhamnosus* GG es efectivo en el tratamiento de la gastroenteritis pediátrica (Hojsak *et al.*, 2010) y diarreas asociadas a tratamiento con antibióticos (Vanderhoof *et al.*, 1999). Sin embargo, no se recomienda usar esta especie en la prevención de las infecciones genitourinarias. En cuanto a los estudios para comprobar su capacidad preventiva, sobre el desarrollo de eczema y sensibilización atópica en niños con riesgo, se han obtenido resultados contradictorios (Majamaa and Isolauri, 1997; Kirjavainen, Salminen and Isolauri, 2003; Viljanen *et al.*, 2005; Fölster-Holst *et al.*, 2006; Grüber *et al.*, 2007).

Recientemente la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO) publicó una guía práctica sobre el uso de probióticos y prebióticos en gastroenterología (Guarner *et al.*, 2017), donde se establecen las patologías puntuales que pueden tratarse con cepas probióticas específicas. Aunque existe evidencia científica de la eficacia de ciertos microorganismos probióticos para procesos agudos del aparato digestivo, en procesos crónicos la información es mucho más limitada. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, que los microorganismos probióticos pueden interactuar con el sistema inmunológico del hospedador (Corthésy, Gaskins and Mercenier, 2007), promoviendo la salud intestinal mediante la estimulación del sistema inmune innato, no por supresión. Es el caso de la formulación probiótico múltiple VSL#3, mezcla de ocho cepas bacterianas diferentes, se ha demostrado un efecto antiinflamatorio beneficioso en ratones (Pagnini *et al.*, 2009), ya que estimula respuestas epiteliales inmunes innatas *in vivo*. En un trabajo realizado por (Schiffirin *et al.*, 2008), usando la cepa de *Lactobacillus johnsonii La1* se demostró que su administración en ancianos con sobrecrecimiento bacteriano intestinal, normalizaba la respuesta frente a endotoxinas bacterianas y modulaba los marcadores de activación en los fagocitos sanguíneos, ayudando a reducir la inflamación crónica de bajo grado. Por otro lado, estudios con *Lactobacillus rhamnosus* HN001 realizados por (Sheih *et al.*, 2001) han evidenciado la capacidad de esta cepa para mejorar la respuesta celular inmunitaria sistémica y aumentar la inmunidad natural, usándose como suplemento dietético. Entre sus mecanismos de acción están el incremento de la capacidad fagocítica de las células polimorfonucleares (PMN) y los monocitos, así como también el incremento de la actividad de las células *natural killer* (NK) en personas adultas o de tercera edad. Mecanismos similares se han observado con *Bifidobacterium lactis* HN019, que aumenta la inmunidad natural por incremento de la capacidad fagocítica de las células polimorfonucleares (PMN). Aunque los dos estudios que lo han documentado han sido realizados con un

pequeño número de individuos (Arunachalam, Gill and Chandra, 2000; Gill *et al.*, 2001).

La microbiota intestinal, que incluye varias especies de *Lactobacillus*, interactúa regularmente con las células del colon, donde se incluyen células presentadoras de antígenos (células dendríticas) (Rescigno, 2001) y células epiteliales intestinales (Sansonetti, 2004). Además, se ha documentado que los lactobacilos pueden facilitar la polarización del sistema inmune, influyendo en la respuesta de los linfocitos T ayudadores 2 (Th2), hacia una respuesta mediada por linfocitos T ayudadores 1 (Th1), y promoviendo así, la inmunidad humoral y mediada por células (Sudo *et al.*, 1997). En el trabajo realizado por Mohamadzadeh *et al.*, 2005, estudiaron los efectos de las cepas *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus reuteri* sobre células dendríticas mieloides (MDCs) concluyendo que estos microorganismos eran capaces de inducir fuertes respuestas inmunes de células T.

De igual forma, *Lactobacillus fermentum* CECT5716, tras ser administrado vía oral junto con la vacunación antigripal, potencia la repuesta inmunológica de la vacuna, aumentando la respuesta de tipo Th1 y la producción de anticuerpos contra el virus (Olivares *et al.*, 2007).

El uso en conjunto de las cepas de *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum* y *B. bifidum*, redujo significativamente los episodios de resfriado común y redujo la gravedad de los síntomas (de Vrese *et al.*, 2005). Cuando se usan cepas únicas como *Lactobacillus johnsonii* La1, administradas en leche fermentada en ancianos se observa que esta cepa contribuye a suprimir las infecciones, mejorando el estado nutricional e inmunológico en los ancianos (Fukushima *et al.*, 2007).

Cabe resaltar, que todas las evidencias científicas observadas utilizan uno o varios microorganismos concretos y lo aplican a cierto tipo de población. Por ello los resultados no siempre son extrapolables a poblaciones con estados fisiológicos o edades diferentes. De hecho, los meta-análisis que han incluido

grupos de población con edades diferentes arrojan resultados distintos en cada grupo de individuos, con datos no extrapolables entre sí.

En el estudio realizado por (Sazawal *et al.*, 2006), donde emplearon cepas de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, entre otras, utilizadas solas o en combinaciones de dos o más cepas, se evidenció que el efecto de las cepas probióticas sobre la diarrea aguda, dependía de la edad del huésped y de las cepas utilizadas.

Por ello, se requiere demostrar los efectos de cada cepa probiótica propuesta, en estudios bien diseñados para cada caso, grupo de población de interés y características fisiológicas particulares si es el caso.

El uso de los probióticos en el tratamiento o prevención de la caries dental está relacionado con su mecanismo de acción interrumpiendo la formación de la biopelícula, por medio de la competencia directa por los sitios de unión en los tejidos del huésped y otras bacterias, la competencia por los nutrientes, o la producción de compuestos antimicrobianos que inhiben a las bacterias orales, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, compuestos antimicrobianos, bacteriocinas e inhibidores de adherencia celular. Este tipo de aproximación, conocida como terapia de reemplazo, ha sido aplicada con éxito para prevenir faringitis causadas por microorganismos, mediante la aplicación de cepas de *Streptococcus salivarius* aisladas de niños sanos, que resultaron ser productoras de bacteriocinas que inhiben el crecimiento de patógenos de la faringe, y ha sido propuesta como estrategia para mejorar la salud bucodental (Tagg and Dierksen, 2003). Además, el desarrollo de probióticos que puedan producir sustancias alcali para neutralizar el pH ácido ha sido también propuesto como estrategia para prevenir la aparición de caries (Nascimento *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016; Geraldeli *et al.*, 2017; Nascimento, 2018). Esos potenciales probióticos podrían producir amonio a partir de urea o de arginina (Reyes *et al.*, 2014; Moncada *et al.*, 2015).

## 1.6 Características beneficiosas de los probióticos orales

Las enfermedades orales como la caries dental o la periodontitis son causadas por microorganismos. Sin embargo, no se consideran actualmente como enfermedades infecciosas en términos clásicos, debido a que su etiología es claramente polimicrobiana (Fejerskov, 2004; Simón-Soro and Mira, 2015) y porque las bacterias patogénicas implicadas se encuentran también en bajas proporciones en individuos sanos (Camelo-Castillo *et al.*, 2014; Hajishengallis and Lamont., 2012).

Por tanto, las estrategias antimicrobianas pueden no ser eficaces contra las enfermedades orales, y se han propuesto nuevos enfoques tanto preventivos como terapéuticos, basados en la restauración del equilibrio ecológico microbiano en la cavidad oral (Marsh, 2015a; Marsh *et al.*, 2015b; Mira, 2018). Estas nuevas medidas preventivas, pueden incluir el uso de compuestos prebióticos que promuevan el crecimiento de bacterias asociadas a la salud oral (Santarpia *et al.*, 2014), o la aplicación de bacterias probióticas con características beneficiosas para mejorar la salud bucodental (Saha *et al.*, 2012). El desarrollo de prebióticos contra las enfermedades orales está todavía en fases preliminares, y se ha sugerido que se deben dirigir más esfuerzos en esta línea de trabajo (Marsh, 2018). En cuanto a los probióticos, han sido descritas y testadas múltiples especies con capacidades beneficiosas, aunque el número de ensayos clínicos es todavía limitado (Devine and Marsh, 2009).

Debido a que el mayor desarrollo de probióticos se ha producido en patologías intestinales, acumulando una fuerte evidencia de seguridad para las bacterias provenientes del intestino, muchos de los microorganismos aislados de muestras fecales humanas o animales con propiedades beneficiosas, están siendo desarrollados como probióticos potenciales para promover la salud oral. Éstos por lo general incluyen cepas de lactobacilos y bifidobacterias (Tabla 1), que han

demostrado efectos inmunomoduladores, anti-inflamatorios y anti-bacterianos en diferentes estudios *in vitro* y también en ensayos clínicos (Reid *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de estas bacterias ha sido criticado porque son acidogénicas y de hecho se han relacionado con la incidencia de caries dental (Badet and Thebaud, 2008; Mantzourani, Fenlon and Beighton, 2009). Por ejemplo, experimentos *in vitro* con lactobacilos demuestran una mayor acidogenicidad de la placa cuando éstos son añadidos a la biopelícula (Pham *et al.*, 2009, 2011). Por ello, diversos autores enfatizan en la necesidad de buscar probióticos orales que provengan de la cavidad bucal y no del intestino, lo cual favorecería su capacidad de colonización, y por supuesto, que no tengan asociación con el proceso cariogénico (Marsh, 2018; Rosier, Marsh and Mira, 2017; Mira, 2018; Nascimento *et al.*, 2017; López-López *et al.*, 2017).

El potencial probiótico de *S. salivarius* se deriva su capacidad para producir una amplia variedad de bacteriocinas. La cepa K12, prototipo de los probióticos de *S. salivarius*, se indica para el tratamiento de la otitis media, la halitosis (Burton *et al.*, 2006) y el dolor de garganta de origen estreptocócico (Burton *et al.*, 2011) (Wescombe *et al.*, 2009). Además, algunas cepas de *S. salivarius* producen exoenzimas, como la dextranasa y la ureasa, que reducirían tanto la acumulación de placa dental como la acidificación de la placa. La cepa *S. salivarius* M18 fue aislada de un adulto sano y se ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio sobre *S. mutans*, gracias a moléculas inhibitorias similares a bacteriocinas (BLIS). Además, también produce enzimas como la dextranasa y la ureasa (Heng *et al.*, 2011), y un gran repertorio de bacteriocinas como la salivaricina A, salivaricina M, salivaricina MPS y salivaricina 9 (Wescombe *et al.*, 2006, 2011). Al testar la efectividad *in vivo* de la cepa, se pudo demostrar que reduce significativamente la formación de placa dental en niños a la vez que los recuentos de *S. mutans*, cuando la cepa logra establecerse en la microbiota oral del huésped (Burton *et al.*, 2013).

La halitosis o mal aliento, afecta hasta la mitad de la población adulta humana (Rosenberg, 1996). Los compuestos de mal olor más comunes son subproductos del metabolismo de bacterias orales, especialmente anaerobias, localizadas en el dorso de la lengua (Scully *et al.*, 1997). Se sabe que contribuyen al mal olor los compuestos volátiles de azufre (VSC), el ácido valérico, el ácido butírico, la putrescina (Loesche and Kazor, 2002), los residuos de comida, las células epiteliales exfoliadas y proteínas salivales que se acumulan en las fisuras de la lengua. Mediante la colonización preventiva de la cavidad oral con la cepa K12 de *S. salivarius*, se logró reducir los niveles orales de los compuestos volátiles de azufre (VSC), tras administrarse después de un enjuague bucal antimicrobiano (Burton *et al.*, 2005).

En cualquier caso, las bacterias probióticas derivadas de lactobacilos también pueden tener efectos beneficios sobre la salud oral, (Devine and Marsh 2009). Varios estudios han demostrado la disminución de los recuentos de *Streptococcus mutans* después de un consumo a corto plazo de *Lactobacillus reuteri* (Caglar *et al.*, 2006; Nikawa *et al.*, 2004). Además, la administración de *Lactobacillus reuteri* en niños durante su primer año de vida se asoció con una menor tasa de incidencia de caries, menor prevalencia de caries proximales y una frecuencia de inflamación gingival estadísticamente más baja que la del grupo control (Stensson *et al.*, 2014). Los lactobacilos son altamente acidogénicos y acidúricos, pero se encuentran principalmente en lesiones de caries profundas (Runarsson, 2009) y, por tanto, no se considera que estén implicados en el inicio de la lesión de caries (Simón-Soro *et al.*, 2013). La capacidad de los lactobacilos probióticos para fermentar los azúcares ha demostrado ser dependiente del tipo de azúcares y variar entre diferentes cepas *in vitro* (Hedberg *et al.*, 2008). Además, estudios recientes demuestran que no existe evidencia de un aumento en la acidez de la placa dental tras suministrar lactobacilos probióticos en presencia de fructosa o xilitol (Keller and Twetman 2012). Por tanto, su uso como potencial probiótico podría tener un efecto beneficioso también para la halitosis.

En cuanto a probióticos para el tratamiento de la enfermedad periodontal, se han propuesto diferentes cepas como *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*. Esta última especie aislada de individuos sanos, ha demostrado *in vitro* que inhibe el crecimiento de muchos microorganismos patógenos orales, como *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis* y *Porphyromonas gingivalis* (Sookkhee, Chulasiri and Prachyabrued, 2001). Los experimentos *in vivo* en adultos sanos indicaron que se requieren por lo menos 2 semanas de administración de *L. paracasei* por vía oral para que su acción probiótica sea eficaz (Chuang *et al.*, 2010). Respecto a los ensayos con *Lactobacillus salivarius*, tras su administración, disminuyó significativamente el número de *Porphyromonas gingivalis* en muestras de placa subgingival de bolsas periodontales. Al evaluar parámetros clínicos como la profundidad y hemorragia al sondaje, se encontró mejoría en los individuos a los que se les había administrado la cepa. Ello sugiere que sea un posible probiótico efectivo en la prevención de la enfermedad periodontal (Matsuoka *et al.*, 2006).

Otras bacterias que se han propuesto como probióticos orales incluyen *Weissella cibaria* aislada del Kimchi coreano, y que es capaz de inhibir la formación *in vitro* de la biopelícula de *S. mutans*, la formación *in vivo* de la biopelícula oral, además de la producción de compuestos volátiles de azufre (Kang *et al.*, 2006b).

Pero incluso si se seleccionan cepas ácidogénicas débiles, la capacidad de las bacterias intestinales para colonizar el nicho oral y para producir efectos anticaries está aún por demostrar. Por lo tanto, el aislamiento e identificación de nuevas cepas aisladas de la propia cavidad oral es decisivo para el desarrollo de probióticos eficientes enfocados a la salud bucodental. En los últimos años, algunos de estos nuevos aislados con potencial probiótico se han logrado aislar de la cavidad oral. El grupo de Marcelle Nascimento en Florida, por ejemplo, aisló 288 cepas de *Streptococcus* con capacidad arginolítica, es decir, capaces de transformar la arginina en amonio y por tanto de tamponar el pH ácido (Huang *et al.*, 2015). Tras cuantificar dicha actividad tamponadora, seleccionaron una de

estas cepas, denominada *Streptococcus* A2, que además tiene actividad inhibitoria frente a *S. mutans*, para ser usada como probiótico (Huang *et al.*, 2016). Por otro lado, el laboratorio de recursos microbianos de la Academia China de Ciencias logró aislar cinco cepas de *S. oligofermentans* a partir de muestras de placa dental y saliva, en individuos sin caries dental (Tong, 2003). Estos aislados parecen tener un efecto beneficioso en la salud oral, gracias a mecanismos de producción de peróxido de hidrógeno que inhiben el crecimiento de *S. mutans* en condiciones constantes y cíclicas de pH, en experimentos de biopelícula *in vitro* (Bao *et al.*, 2015).

Un resumen de aquellas cepas sobre las que se han realizado ensayos clínicos se detalla en la Tabla I1.

**Tabla I1.** Bacterias testadas en ensayos clínicos, como probióticos para la salud bucodental. Adaptada de López-López A *et al.*, 2017

CEPA	ORIGEN	NOMBRE COMERCIAL	ENFERMEDAD	AERENCIA
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Tracto Gastrointestinal		Caries	(Aminabadi <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Tracto Gastrointestinal		Caries	(Stecksén-Blicks, Sjöström and Twetman, 2009)
<i>Lactobacillus reuteri</i> 55730 + PTA 5289	Leche Materna	Prodentis™	Salud gingival, reducción de la placa y caries	(Krasse <i>et al.</i> , 2006) (Caglar <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lactobacillus brevis</i> CD2	Productos lácteos	Inersan®	Enfermedad periodontal y caries	(Riccia <i>et al.</i> , 2007) (Campus <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lactobacillus paracasei</i> SD1	Cavidad oral humana		Caries	(Ritthagol, Saetang and Teanpaisan, 2014)
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010	Productos lácteos	ACTIVIA®	Caries	(Caglar <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB-12®	Cultivos lácteos	BB-12®	Caries	(Caglar <i>et al.</i> , 2008)
<i>Streptococcus salivarius</i> M18	Saliva niño sano	BLIS M18®	Reducción de la placa	(Burton <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lactobacillus salivarius</i> WB21	Tracto digestivo en mamíferos		Salud gingival, enfermedad periodontal, halitosis y caries	(Shimauchi <i>et al.</i> , 2008) (Mayanagi <i>et al.</i> , 2009) (Suzuki <i>et al.</i> , 2014) (Nishihara <i>et al.</i> , 2014)
<i>Streptococcus oralis</i> KJ3®, <i>Streptococcus uberis</i> KJ2® and <i>Streptococcus rattus</i> JH145®	Bocas sanas	ProBiora(3)®	Caries, enfermedad periodontal y halitosis	(Zahradnik <i>et al.</i> , 2009)

CEPA	ORIGEN	NOMBRE COMERCIAL	ENFERMEDAD	REFERENCIA
<i>Weissella cibaria</i> CMU, CMS-1, CMS-2 and CMS-3	Saliva en niños		Halitosis y reducción de la placa	(Kang <i>et al.</i> , 2006 a) (Kang <i>et al.</i> , 2006 b)
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 + PTA 5289	Saliva Humana	BioGaia ProDentis	Halitosis	(Keller <i>et al.</i> , 2012)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 7481 and <i>Lactobacillus brevis</i> 7480	Saliva en niños	AB:Dentis®	Halitosis y gingivitis	WO 2012022773 A1*
<i>Streptococcus salivarius</i> K12	Saliva en niños	BLIS K12®	Halitosis	(Burton <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NK1 + 100ash + K3III24	Tracto Gastrointestinal	Acilact (solely Russia)	Enfermedad periodontal	(Pozharitskaia <i>et al.</i> , 1994)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> N1 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> NK1	Tracto Gastrointestinal	Bifidumbacterin + Acilact (solely Russia)	Enfermedad periodontal	(Grudianov <i>et al.</i> , 2002)
<i>Lactobacillus casei</i> 37	Tracto Gastrointestinal		Enfermedad periodontal	(Volozhin <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lactobacillus paracasei</i> GMNL-33 (ADP-1)	Cavidad Oral Humanos	Dental-Lac™	Enfermedad periodontal	(Chuang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lactobacillus salivarius</i> TI 2711 (LS 1)	Saliva Humana		Enfermedad periodontal	(Matsuoka <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (53103) + LC705	Tracto Gastrointestinal		Candidiasis oral	(Hatakka <i>et al.</i> , 2007)

## 1.7 Caracterización de cepas con potencial probiótico

Los aislados que se pretenden usar como probióticos, al ser utilizados en alimentos o como suplemento alimenticio, deben estar perfectamente caracterizados y cumplir unas estrictas condiciones de seguridad.

Los métodos más frecuentes y que todavía se utilizan en la identificación de las bacterias consisten en determinar la presencia o ausencia de marcadores bioquímicos específicos, como por ejemplo la capacidad de fermentar hidratos de carbono concretos o la utilización de diferentes compuestos como fuente de carbono para poder proliferar, así como la presencia de enzimas hidrolíticas específicas como lipasas y nucleasas. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas. El resultado se coteja y compara con pruebas estandarizadas o en base a perfiles numéricos de identificación. En la presente tesis, se usarán este tipo de pruebas para la caracterización fenotípica clásica de las cepas de *S. dentisani* 7746 y 7747 que se han propuesto como probióticos anticaries.

Además, hay que tener en cuenta que el desarrollo de los nuevos métodos de secuenciación masiva como la pirosecuenciación o la secuenciación Illumina permiten hoy en día poder obtener la secuencia del genoma completo de

bacterias de forma asequible y rápida. La similitud del genoma con otros secuenciados permite establecer si se trata de una especie nueva incluso con más fiabilidad que las pruebas fenotípicas, hasta el punto que la similitud de secuencia del genoma completo, o ANI por sus siglas en inglés (Average Nucleotide Identity) se ha convertido en el “gold standard” para delimitar las especies bacterianas (Goris *et al.*, 2007; Richter and Rosselló-Móra, 2009). Además, la secuencia del genoma permite conocer el potencial genético de las cepas, así como detectar si existen posibles genes de virulencia o genes de resistencia a antibióticos con posibles repercusiones para la salud humana. Por todo ello, en la presente tesis se han complementado las pruebas fenotípicas clásicas con el análisis del genoma de las dos cepas bajo estudio.

### **Condiciones de cultivo de los probióticos**

En el caso de organismos probióticos con fines comerciales, la determinación de las condiciones de cultivo óptimas para el crecimiento es un paso fundamental para la viabilidad de su desarrollo como probiótico. Los parámetros que se tienen en cuenta a la hora de fijar el protocolo de crecimiento para una especie en concreto deben incluir tanto aspectos fisiológicos como químicos; dentro de los fisiológicos se encuentran la atmósfera a la cual la bacteria tiene un buen crecimiento tanto en número de células como en tamaño de las colonias, el pH necesario para su crecimiento, el margen de crecimiento a distintas temperaturas y la presión osmótica (Gobernado and López-Hontangas, 2003); en los químicos encontramos las fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, oligoelementos, y factores nutricionales especiales (Pumarola, 1990).

Además de determinar el medio de cultivo óptimo para maximizar la tasa de crecimiento con un coste reducido, en el caso del probiótico anticaries objeto de esta tesis, establecimos las condiciones de cultivo óptimas para la producción de las sustancias con actividad beneficiosa para la salud, en este caso tanto los

inhibidores del crecimiento de otros microorganismos cariogénicos como el amonio generado a partir de la arginina mediante la ruta arginolítica.

### 1.8 Descubrimiento de *Streptococcus dentisani* sp. nov.

El grupo de microbiología oral del Centro Superior de Investigación en Salud Pública de Valencia (hoy Fundación FISABIO), en un trabajo realizado en el año 2011 comparó muestras de placa dental de pacientes con caries frente a pacientes que nunca en su vida han sufrido de esta patología, y mediante análisis metagenómico pudieron determinar que los pacientes sin caries presentaban una ausencia total de bacterias cariogénicas como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Sin embargo, en el microbioma de estos pacientes se observaron otras especies de estreptococos a muy alta frecuencia, cepas cercanas a *S. mitis* y especies del género *Neisseria* (Belda-Ferre *et al.*, 2012; Alcaraz *et al.*, 2012), que en otros estudios han sido tradicionalmente asociados a estados de buena salud oral (Rosier, Marsh and Mira, 2017). Partiendo de la hipótesis de que algunas de las bacterias predominantes en pacientes sin caries mostraran un efecto antagónico sobre bacterias cariogénicas, se aislaron muestras provenientes de placa dental de 10 voluntarios sanos (sin antecedentes de caries dental) y se cultivaron en distintos medios de cultivo: agar infusión cerebro corazón (ICC), agar sangre (AS), agar Brucella, agar chocolate (ACh), agar Luria (Miller's LB) y agar soja y tripticaseína (TSA) (Condalab-Pronadisa), bajo atmósfera de aerobiosis a 37°C por 24 a 72 horas (Belda-Ferre *et al.*, 2011). Al término de la incubación se obtuvieron 249 aislados y se seleccionaron las colonias que al observarlas microscópicamente presentaban una morfología tipo coco, agrupados en pares o cadenas. Se realizaron ensayos de inhibición frente a cultivos en tapiz de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, identificando 16 aislados que mostraron halos de inhibición frente a *S. mutans*, a los cuales se les realizó PCR del gen ribosómico 16S, clasificando 15 de ellos dentro del género

*Streptococcus* y solamente uno en el género *Rothia*. De estos 16 aislados, se seleccionaron dos en base a su mayor capacidad inhibitoria y se testaron en un modelo de biopelícula artificial para comprobar que eran capaces de colonizar una biopelícula oral y hacerla menos cariogénica. Demostraron que ambos aislados eran activos en la inhibición de la formación de la biopelícula y en la reducción del ácido láctico producido, aunque con distinta eficiencia en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Aparte de establecerse en la biopelícula, estas cepas también produjeron la disminución de bacterias involucradas en la producción de ácido como *Veillonella*, dejando la mayor parte de las bacterias del ecosistema inalterado. Por lo tanto el grupo del Dr. Alex Mira propuso estos aislados como posibles probióticos para prevenir la caries dental.

Ya que los aislados no se incluían dentro de una especie conocida y presentaban propiedades de inhibición frente a especies ácidogénicas como *Streptococcus mutans*, se propuso en la presente tesis caracterizarlas y describirlas. Se determinó que ambas cepas pertenecían a una nueva especie, que inicialmente denominamos *Streptococcus anticariensis*, y finalmente *Streptococcus dentisani* sp.nov, y se planteó la posibilidad de desarrollarlo como un potencial probiótico para prevenir la aparición de caries dental.

La capacidad de producir un efecto beneficioso para la salud es la propiedad esencial que caracteriza a un probiótico, y por tanto durante esta tesis también se caracterizaron los posibles efectos probióticos de estos aislados, entre los que se identificaron y describieron no sólo el antibacteriano inicial, sino también el arginolítico - tamponador. La caracterización adecuada del microorganismo según las recomendaciones del grupo OMS/FAO debe incluir su identificación a nivel de género, especie y cepa por medios fenotípicos (propiedades biológicas expresadas in vitro) y genotípicos (secuenciación de sus genes) especialmente de

fragmentos del gen 16S rRNA, y descripción de métodos para su identificación en medios biológicos por técnicas específicas incluyendo técnicas de “fingerprinting” como PFGE o similares y depósito de la cepa en colecciones reconocidas internacionalmente. Además, ensayos en modelos animales y en simuladores de digestión pueden ayudar a evaluar los parámetros de seguridad que son necesarios a nivel regulatorio. Por ello, en la presente tesis se realizó la descripción taxonómica de la nueva especie, así como la caracterización de su potencial efecto beneficioso para la salud bucodental (en concreto su efecto antimicrobiano y antiácido) y su adecuación como probiótico para prevenir la caries. Para ello se han realizado estudios filogenéticos, genómicos, informáticos, bioquímicos, microscópicos, microbiológicos y moleculares, así como ensayos en modelos animales, *in vitro* y de simulador gastrointestinal, que en su conjunto suponen la base experimental para probar la eficacia del probiótico en ensayos clínicos en seres humanos, y por tanto su desarrollo como estrategia preventiva frente a la caries.



## **OBJETIVOS**

---



## OBJETIVOS

### 1. Objetivo General:

Caracterizar *Streptococcus dentisani* sp. nov., desde el punto de vista taxonómico y funcional, determinando su potencial actividad beneficiosa para la salud bucodental y evaluando su posible uso como probiótico.

### 2. Objetivos específicos:

- Describir fenotípicamente las cepas de *Streptococcus dentisani* indicando sus características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas.
- Demostrar mediante análisis filogenéticos si las cepas *S. dentisani* 7746 y 7747 son una nueva especie, basándonos en el análisis de los genes 16S, 23S y *sodA*, así como en datos genómicos como el ANI (Average Nucleotide Identity).
- Identificar la prevalencia de *S. dentisani*. en individuos sin caries dental.
- Describir el efecto inhibitorio de *S. dentisani* frente a patógenos asociados a enfermedades orales como la caries dental, la periodontitis, y la halitosis.
- Determinar la naturaleza de la actividad inhibitoria del sobrenadante de cultivo de *S. dentisani*, y cuantificar la misma en diferentes fases de cultivo bacteriano, en distintos medios de cultivo y en distintas fracciones separadas por tamaño.

- Describir la isla genómica anti-caries en *S. dentisani* 7746, prediciendo y caracterizando las posibles moléculas con potencial inhibitorio frente a microorganismos patógenos bucodentales.
- Comparar los perfiles transcriptómicos de *S. dentisani* a distintos pH, en presencia y ausencia de *S. mutans*, y en diferentes etapas de crecimiento bacteriano.
- Caracterizar la actividad arginólítica de *S. dentisani* para tamponar el pH extracelular.
- Demostrar la seguridad de las cepas de *S. dentisani*, identificando posibles genes de virulencia, de resistencia a antibióticos o la presencia de elementos móviles.
- Determinar parámetros como el pH, la temperatura, el medio y las condiciones de cultivo óptimas, necesarios para optimizar la producción a gran escala de las cepas de *S. dentisani*, así como la resistencia de las cepas a procesos de congelación y liofilización.
- Cuantificar la capacidad de *S. dentisani* para producir metabolitos no deseados.
- Establecer mediante ensayos de digestión *in vitro* la resistencia de *S. dentisani* al proceso digestivo.
- Identificar la seguridad de las cepas de *S. dentisani* mediante ensayos de toxicidad en ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos.

## **CAPÍTULO 1**

### **CARACTERIZACIÓN DE LA NUEVA ESPECIE**

---



## 1. INTRODUCCIÓN

Los *Streptococcus* orales humanos son comensales que a menudo habitan el tracto gastrointestinal, el genitourinario, la mucosa oral y la superficie de los dientes, y dependiendo de la especie pueden estar asociados a un buen estado de salud (Belda-Ferre *et al.*, 2012). En individuos sanos, los *Streptococcus* pueden constituir más del 50% de la microbiota oral (Human Microbiome Project C, 2012) y estas bacterias generalmente poseen un potencial patogénico bajo. Sin embargo, algunos *Streptococcus* orales pueden invadir el torrente sanguíneo y tienen el potencial de causar endocarditis infecciosa o septicemia post-antineoplásica en pacientes neutropénicos, con enfermedad hematológica. Otras afecciones relacionadas con *Streptococcus* orales incluyen infecciones odontofaciales, abscesos cerebrales e infecciones abdominales (Westling, 2005). Las dos especies del grupo de salivarius asociadas con seres humanos (*Streptococcus salivarius* y *Streptococcus vestibularis*) se consideran generalmente de baja virulencia, aunque se han descrito infecciones ocasionales como bacteriemia y meningitis (Conangla *et al.*, 2004). Algunas especies del grupo bovis causan endocarditis, particularmente asociada con neoplasia del colon (Ruoff *et al.*, 1989; Gold, 2004). Por otro lado, *Streptococcus mutans* es conocido por su potencial acidogénico y por estar involucrado en la formación de caries dental, la pérdida de piezas dentales (Loesche *et al.*, 1975; Hamada and Slade 1980) y, probablemente, en endocarditis subaguda (Banas, 2004). Así mismo, se cree que algunas cepas de *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii* y *S. anginosus* consideradas como "Streptococcus de baja acidogenicidad", tienen un papel en la iniciación de la caries, tal vez preparando el nicho para favorecer del crecimiento de *S. mutans*, u otras especies altamente acidogénicas que fomentan la progresión de la enfermedad (Banas *et al.*, 2016).

Las secuencias del gen ribosómico 16S rRNA han sido aceptadas como la base más informativa para el análisis filogenético y la identificación de microorganismos (Kawamura *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1996; Clarridge *et al.*, 2001; Bosshard *et al.*, 2004). Sin embargo, debido al elevado grado de conservación de la secuencia de este gen en los estreptococos, no siempre resulta adecuado para la identificación de muchas de las especies de *Streptococcus* como *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* y *S. oralis*, que comparten entre ellas más del 98% de identidad. Se ha utilizado como alternativa la secuenciación de otros genes esenciales o "housekeeping" para identificar *Streptococcus*, por ejemplo, los genes que codifican para la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Drancourt *et al.*, 2004), la D-alanina--D-alanina ligasa (*ddl*) (Garnier *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 1999), el ARN de la subunidad de RNasa P (*rnpB*) (Innings *et al.*, 2005), el factor de elongación (*tuf*) (Picard *et al.*, 2004), la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*sodA*) (Poyart *et al.*, 1998; Kawamura *et al.*, 1999; Poyart, Quesnes, and Trieu-Cuot, 2000; 2002), las proteínas de choque térmico (*groESL*) (Teng *et al.*, 2002), el espaciador intergénico del gen tRNA (De Gheldre *et al.*, 1999; Baele *et al.*, 2000, Baele *et al.*, 2001) y la glutamato deshidrogenasa (*GDH*) (Okwumabua, O'Connor and Shull, 2003).

Las aproximaciones para determinar los marcadores definitivos para la correcta identificación de especies de *Streptococcus* en términos de uso y coste, están siendo solventadas en parte mediante las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (Innings *et al.*, 2005). La secuenciación masiva y, en paralelo el desarrollo de la bioinformática, ha permitido a los investigadores obtener secuencias de genomas completos bacterianos en cuestión de días y aun coste muy asequible. Así pues, la comparación de los genomas completos de aislados microbianos de importancia clínica o biotecnológica, constituye una de las mejores herramientas para determinar su posición filogenética en un grupo

específico de microorganismos, reemplazando la clásica aproximación de hibridación DNA-DNA (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Richter and Rosselló-Móra, 2009). Por ello, durante el presente estudio se realizó la secuenciación completa de dos cepas aisladas de placa dental de pacientes que no habían padecido nunca caries. Para maximizar la robustez en los análisis, se propuso la utilización de la Identidad Nucleotídica Promedio (valor “ANI” por sus siglas en inglés, Average Nucleotide Identity) de todos los genes conservados, para medir así la relación genética entre dos cepas.

Son varias las ventajas de utilizar el ANI. Por un lado, es un descriptor general de la relación genética, simple y útil. Se deriva de los genes específicos del linaje, además de los genes ampliamente distribuidos (generalmente > 1.000 genes en total), aumentando la robustez y la resolución de la señal filogenética extraída. Por otra parte, debido a la gran cantidad de genes utilizados en los cálculos, la utilización del ANI es superior que al emplear un solo gen (como el gen 16S rRNA) y no debería ser propenso a tasas evolutivas variadas o transferencias horizontales de uno o varios genes.

Además, también se ha demostrado que el ANI se correlaciona fuertemente con la identidad de secuencia del gen 16S rRNA y puede resolver áreas en las que el uso del gen 16S rRNA es inadecuado, como lo es a nivel de especies. Así mismo, el ANI demuestra una fuerte correlación lineal con los valores de reasociación DNA-DNA. Por lo tanto, las cepas que muestran un valor de ANI >94%, deben pertenecer a la misma especie, de acuerdo con el valor de reasociación estándar DNA-DNA (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Richter and Rosselló-Móra, 2009).

Otras herramientas genómicas que son muy útiles son los reclutamientos metagenómicos, que consisten en comparar la secuencia del genoma de una especie de referencia frente a las secuencias del ADN total del ambiente en el

que vive (el metagenoma de esa comunidad microbiana). Estos reclutamientos dan una idea de la proporción de esa especie de referencia en la muestra (mediante el grado de cobertura o densidad de puntos en el gráfico) y de la presencia de la misma o similar cepa en dicho ambiente (mediante la detección de secuencias al 99-100% de similitud). Estos gráficos de reclutamiento se han utilizado para cuantificar la presencia de determinadas bacterias en nichos humanos y para identificar zonas del genoma ausentes en cepas cercanas que habitan en ese nicho (Belda-Ferre *et al.*, 2011). Los reclutamientos metagenómicos son por ello, la mejor forma de realizar estas comparaciones. Las lecturas metagenómicas individuales darán un umbral de identidad frente al genoma bacteriano de referencia, de forma tal que son "reclutadas" y permitirán trazar un gráfico que variará en densidad, dependiendo de la abundancia de ese organismo en la muestra. Mediante este procedimiento, en el presente capítulo hemos podido determinar la prevalencia de *S. dentisani* en los metagenomas disponibles de muestras orales de pacientes sanos.

Identificar posibles genes de virulencia cobra mucha importancia, por ejemplo cuando se cuenta con el genoma secuenciado de una bacteria con potencial probiótico, ya que es una manera de poder evaluar su posible toxicidad. Las directrices de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), especifican que es indeseable la presencia de genes de resistencia a los antimicrobianos y factores de virulencia en una cepa con potencial uso en humanos. La base de datos de factores de virulencia (VFDB) contiene las secuencias de 2353 genes, que representan 408 factores de virulencia y 24 islas de patogenicidad, y ha sido propuesta, como una forma de identificar genes de virulencia conocidos, en genomas secuenciados (Bennedsen *et al.*, 2011).

En este capítulo, se presenta la caracterización taxonómica de estos nuevos aislados, sus características bioquímicas, macroscópicas y microscópicas, además de su caracterización taxonómica y genómica, que nos permitió proponerlos como una nueva especie dentro del género *Streptococcus*. Además, y con el fin de ser utilizado como probiótico oral, se evaluó la presencia de genes de virulencia y elementos móviles. Finalmente, se estudió su prevalencia en sujetos sanos mediante análisis *in silico*, en individuos procedentes de áreas geográficas diferentes a la española.

### 1.1 Aislamiento e identificación de *S. dentisani*

La comunidad bacteriana presente en la placa dental es muy compleja y por ello, durante años ha sido difícil la determinación de los agentes causales de la caries dental, aunque muchos trabajos citan como principales agentes causales a especies del género *Streptococcus*, como *S. mutans* y *S. sobrinus* (Loesche 1986). Pero a la vez, la cavidad oral es un nicho rico en *Streptococcus* que pueden contribuir a la salud oral, ya que algunas especies se asocian a individuos que nunca han tenido caries, como se refleja en el estudio realizado por Belda-Ferre *et al.*, en 2012. Estos *Streptococcus* forman parte del denominado grupo mitis, y podrían ser usados como potenciales probióticos contra la caries (Collado *et al.*, 2012).

Como se mencionaba en la introducción de la presente tesis, el grupo de trabajo de microbiología oral del Dr. Alejandro Mira comparó en estudios previos la placa dental de pacientes con caries frente a individuos que nunca en su vida han sufrido de esta patología (técnicamente, pacientes con índice CAO=0, que indica que no tienen dientes careados, ni ausentes ni obturados). Los hallazgos encontrados se detallan en el artículo de (Belda-Ferre *et al.*, 2012), en el que a partir de análisis metagenómicos se comprobó que los individuos sin caries presentaban una ausencia total de bacterias cariogénicas, como *Streptococcus*

*mutans* y *Streptococcus sobrinus*, pero con presencia de un gran número de bacterias pertenecientes a los géneros *Neisseria* y *Streptococcus*, donde en este último género se observaba una alta proporción de una especie perteneciente al grupo mitis-oralis-sanguis, hasta la fecha desconocida.

Con estos datos, se comenzó la búsqueda de nuevas especies bacterianas en el nicho oral, por medio de técnicas microbiológicas convencionales, centrándose en la búsqueda de especies pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Neisseria*. Para ello, se reclutaron inicialmente 10 voluntarios, 5 que nunca habían tenido caries dental, con un índice CAO igual a 0 (determinado por un dentista mediante exploración bucodental) y 5 individuos con historial de caries dental.

De entre todos los aislados crecidos en los diferentes medios de cultivo utilizados, se llevó a cabo una selección de las colonias a partir de sus rasgos morfológicos y su aspecto celular bajo el microscopio. Se eligieron las cepas que tenían una morfología característica de especies pertenecientes a los géneros *Streptococcus* o *Neisseria* (cocos, diplococos o cocos agrupados en cadenas) por ser los géneros típicamente asociados a salud oral en nuestro trabajo o en otros (ver, por ejemplo Zaura *et al.*, 2009). El total de aislados obtenidos fue de 406, 192 correspondientes a individuos que nunca habían tenido caries y 214 en voluntarios que habían tenido caries, y todos los aislados fueron testados en ensayos de inhibición frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*. Las cepas con potencial inhibitorio fueron identificadas mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. Se observó que la mayor proporción de especies encontradas pertenecían al género *Streptococcus*, representando un 76% de los aislados en individuos sin caries y un 62% en los voluntarios con caries. Para evaluar si el efecto inhibitorio se debía a la producción de peróxido de hidrógeno se realizaron tratamientos con distintas proteinasas para demostrar si la inhibición era producida por moléculas de naturaleza peptídica, estando esta parte descrita en el capítulo 2 de la presente tesis, donde se ha tratado de caracterizar las moléculas inhibitorias.

Dos de las cepas que demostraron mayor capacidad de inhibición frente a las especies ácidogénicas testadas, fueron secuenciadas completamente en este capítulo y propuestas como una nueva especie de *Streptococcus*, planteando la posibilidad de usarlas como un potencial probiótico frente a la caries dental. Estos aislados se depositaron en la colección española de cultivos tipo (CECT) donde fueron almacenados e identificados como *Streptococcus dentisani* sp. nov. Str. 7746 (CECT 8313) y *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> (CECT 8312<sup>T</sup>). Un segundo depósito fue enviado al instituto Leibniz, a la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ), donde las cepas de *S. dentisani* Str. 7746 y *S. dentisani* Str. 7747 fueron identificadas como DSM 27089 y DSM 27088<sup>T</sup> respectivamente.

Así pues, en el presente capítulo, se realizaron las pruebas filogenéticas, bioquímicas, microscópicas y genéticas para caracterizar estos dos aislados y proponer que constituían una nueva especie, así como detectar su presencia en muestras orales secuenciadas procedentes de distintas partes del mundo para determinar si se trata de un habitante habitual de la microbiota oral.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Características macroscópicas y microscópicas de las cepas

Para determinar las características macroscópicas de *S. dentisani* sp. nov. se realizaron cultivos bacterianos a partir de aislados glicerolados de las cepas 7746 y 7747 conservados a -80°C. Los medios de cultivo empleados fueron agar sangre suplementado con un 5% de sangre de carnero desfibrinada (Condalab<sup>®</sup>) y agar infusión cerebro corazón (agar ICC Condalab<sup>®</sup>). Se incubaron durante 48 y 72 horas, en atmósferas de aerobiosis y anaerobiosis, respectivamente. La medición de las colonias se realizó por medio del software ProgRes<sup>®</sup> Capture Pro 2.6. (Jenoptik).

Las características microscópicas se identificaron mediante tinción con coloración de Gram y microscopía electrónica. Para la tinción de Gram, se depositó una gota de solución salina estéril en un portaobjetos, se tomó una colonia representativa de cada cepa con asa estéril y se realizó una suspensión bacteriana que fue fijada al portaobjetos por medio de calor. Posteriormente se realizó la tinción Gram como se detalla en (Coico, 2005) y se procedió a su lectura en objetivo de 100 X. Para la visualización de la morfología celular a nivel más detallado mediante microscopía electrónica, se cultivaron aislados glicerolados de las cepas (7746-7747) en caldo infusión cerebro corazón (ICC) durante 48 horas en atmósfera de aerobiosis a 37°C. Tras la incubación, se recolectó una alícuota de 200 µl de cultivo y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, para sedimentar las células bacterianas. Al término de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 500 µl de medio Karnovsky (20 ml de formaldehído 10%, 10 ml de glutaraldehído 25% , y 70 ml de cacodilato de sodio 0.2M ) refrigerándolas a 4°C hasta su procesamiento. Posteriormente, fueron fijadas con tetraóxido de osmio al 1% en PBS durante

una hora, se realizaron series de deshidratación haciendo lavados con etanol al 30%, 50%, 70%, 80%, con un tiempo de 10 minutos por cada lavado y finalmente un lavado de 15 minutos con etanol absoluto. Finalmente se realizó una deshidratación en punto crítico y un metalizado con oro-paladio. Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido S-4800 (HITACHI).

## 2.2 Características bioquímicas de las cepas

### 2.2.1 Pruebas de Catalasa y Oxidasa

Para la prueba de la catalasa se colocó una gota de peróxido de hidrogeno sobre una placa portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur y sobre ella se suspendieron 5 colonias bacterianas, visualizando la producción o no de burbujas. La prueba de la oxidasa se realizó sobre una placa portaobjetos sobre la cual se depositó un disco que contiene oxalato de dimetil-para-fenilendiamina, el cual fue humedecido con una gota de agua estéril usando una pipeta Pasteur y sobre el disco fueron puestas algunas de las colonias en estudio (un disco por cepa). La reacción se consideró como positiva al observar un cambio de color en el disco, usualmente tonalidades entre rojo oscuro y violeta.

### 2.2.2 Pruebas bioquímicas mediante galerías API

La identificación de las características bioquímicas de las cepas de *S. dentisani* se llevó a cabo utilizando las galerías API® 20 Strep y API® 50 CH. Para la realización de estas pruebas se usaron colonias de las cepas 7746 y 7747, que se suspendieron en 0,3 ml de agua estéril y se homogenizaron hasta obtener una suspensión con una turbidez superior a 4 en la escala de MacFarland (D.O 1.0). Esta suspensión fue utilizada para inocular agar sangre suplementado con sangre de carnero al 5%, realizando una siembra por duplicado e incubando las placas en aerobiosis a 37°C durante 48 horas. Para comparar las propiedades

bioquímicas de los aislados se usaron las cepas de referencia de *Streptococcus mitis* ATCC 49465, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, *Streptococcus infantis* JCM 10157 y la cepa patentada *Streptococcus salivarius* str Mia DSM 14685.

Para la preparación de la galería API® 20 Strep en el fondo de la cámara de incubación se depositaron 5 ml de agua destilada, repartiéndola en todos los pocillos para crear un atmosfera húmeda y sobre el fondo se depositó la fila de pocillos respectiva. Para la preparación del inóculo se empleó una ampolla de API Suspension Medium (2 ml). Con la ayuda de un escobillón estéril se realizó una suspensión homogénea con el cultivo anteriormente preparado, con una turbidez superior a 4 en la escala de MacFarland (D.O 1.0) y se siguieron las instrucciones del fabricante. La identificación se realizó utilizando la base de datos (V7.0) por medio del software de identificación apiweb TM.

En cuanto a la galería API® 50 CH, en el fondo de la cámara de incubación se creó una cámara húmeda con 10 ml de agua destilada, y sobre ella se depositaron los micropocillos en orden del 0 al 49. El inóculo se preparó como se explicó anteriormente. El perfil bioquímico obtenido se identificó mediante el apiweb TM.

A partir de los resultados obtenidos mediante las galerías API® se creó una matriz binaria teniendo en cuenta los siguiente criterios de asignación; a las reacciones bioquímicas positivas se les asignó el número 1, a las reacciones variables el 0,5 y a las negativas el 0. Las distancias entre las cepas fueron calculadas usando el coeficiente de Pearson mediante el uso del servidor <http://genomes.urv.cat>, empleando el método UPGMA. Finalmente el fichero de texto obtenido fue transformado en un dendrograma usando el visor de árboles phylowidget.

### 2.3 Análisis filogenéticos

Para clarificar la relación entre las cepas de *Streptococcus dentisani* con especies cercanas, como *Streptococcus oralis* o *Streptococcus mitis*, y definir su grado de identidad a nivel de ADN, realizamos el análisis de ANI (Average Nucleotide Identity, (Konstantinidis and Tiedje, 2005). Los valores de ANIb y ANIm (Konstantinidis and Tiedje, 2005), basados en BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y MUMmer (Kurtz *et al.*, 2004) respectivamente, fueron calculados usando la aplicación JSpecies v1.2.1 (Richter and Rosselló-Móra, 2009). Para la comparación usamos 65 genomas completos y 72 borradores de especies del género *Streptococcus* disponibles en el GenBank y obtenidas en el Human Microbiome Project (HMP <https://hmpdacc.org/>).

Los genes *sodA*, y los ribosómicos 16S y 23S fueron identificados en los genomas secuenciados y se extrajeron para su análisis. Las secuencias del gen de la superóxido dismutasa dependiente de Mn (*sodA*), 16S y 23S rRNA de distintas especies de *Streptococcus* se obtuvieron del GenBank mediante los siguientes números de acceso: NC\_004116.1 (*Streptococcus agalactiae* 2603V/R), NC\_012891.1 (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS 124), NC\_002737.1 (*S. pyogenes* M1 GAS), NZ\_AENS00000000.1 (*S. pseudoporcinus* SPIN 20026), NZ\_AEUU00000000.2 (*S. porcinus* Jelinkova 176), NC\_012004.1 (*S. uberis* strain 0140J), NC\_015558.1 (*S. parauberis* KCTC 11537), NC\_012471.1 (*S. equi* subsp. *equi* 4047), NC\_009442.1 (*S. suis* strain 05ZYH33), NC\_015678.1 (*S. parasanguinis* ATCC 15912 T ), NZ\_AEQR00000000.1 (*S. australis* ATCC 700641 T ), NZ\_AFNN01000000 (*S. infantis* SK1076), NZ\_AEVF00000000.1 (*S. peroris* ATCC 700780 T ), NZ\_AEEP00000000.1 (*Streptococcus oral* taxon 071 strain 73H25AP), NC\_015291.1 (*S. oralis* Uo5), NC\_003028.3 (*S. pneumoniae* TIGR4), NC\_013853.1 (*S. mitis* strain B6), NC\_009785.1 (*S. gordonii* Challis), NC\_009009.1 (*S. sanguinis* strain SK36), NZ\_AEVC00000000.1 (*S. cristatus* ATCC 51100 T), NZ\_AEKN00000000.1 (*S. downei* F0415), NC\_004350.2 (*S.*

*mutans strain UA159*), NZ\_AFIM00000000.1 (*S. anginosus SK52 T*), NC\_006449.1 (*S. thermophilus strain CNRZ1066*), NZ\_ACLO01000000 (*S. salivarius SK126*), NZ\_AEVI00000000.1 (*S. vestibularis ATCC 49124 T*), NC\_015215.1 (*S. gallolyticus ATCC BAA-2069*), NC\_015600.1 (*S. pasteurianus ATCC43144*), NZ\_AEEL00000000.1 (*S. bovis ATCC 700338*), NZ\_AEVB00000000.1 (*S. equinus ATCC 9812 T*), NZ\_ABJK00000000.2 (*S. infantarius ATCC BAA-102 T*) y NZ\_AEUV00000000.2 (*S. criceti HS-6*).

Se realizó un alineamiento de las secuencias de los genes 16S rRNA y *sodA* por separado y de los genes 16S y 23S rDNA concatenados mediante algoritmos de refinamiento iterativo implementados en MAFFT y herramientas ProbCon (Kato *et al.*, 2002; Do *et al.*, 2005;). La topología del árbol fue calculada utilizando el método de intercambio del vecino más cercano (NNI) y las longitudes de las ramas fueron calculadas por medio del algoritmo de máxima verosimilitud. Los árboles en formato Newick fueron visualizados y editados usando la herramienta ETE basada en Python (Huerta-Cepas, Dopazo and Gabaldón, 2010).

La posición filogenética de *S. dentisani Str. 7746* y *S. dentisani Str. 7747* fue analizada en profundidad, mediante reconstrucción de árboles basados en las secuencias de los dos marcadores moleculares relevantes, el gen de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*sodA*) y la longitud total de el gen 16S rRNA, asimismo con los genes 16S y 23S rDNA concatenados.

## 2.4 Caracterización genómica

Los genomas completos de *S. dentisani 7746* y *7747* se obtuvieron por secuenciación masiva mediante pirosecuenciación utilizando el secuenciador 454-FLX (Roche) con química Titanium, realizando las librerías tipo “paired-ends” mediante las especificaciones del fabricante, en el Área de Genómica del Centro Superior de Investigación en Salud Pública (Valencia). El ensamblado de

las secuencias se realizó mediante el software Newbler (454 Life Sciences), dando un total de 8 y 10 contigs para las cepas 7746 y 7747 con tamaños comprendidos entre las 2000 y 1.100.000 pb. Estos contigs fueron depositados en la base de datos de la European Nucleotide Archive (ENA) perteneciente al EMBL–EBI, con números de acceso CAUJ01000001–CAUJ01000008 y CAUK01000001–CAUK01000006 para la cepa 7746 y 7747 respectivamente.

#### 2.4.1 Genes de virulencia

La determinación de posibles genes de virulencia se realizó usando la base de datos de genes de virulencia (Virulence Factors Database, VFDB) que contiene secuencias de 408 factores de virulencia y 24 islas de patogenicidad (M. Bennedsen *et al.*, 2011). Las secuencias fueron descargadas en un archivo excel e importadas al Genomic Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark) convirtiéndolas en un genoma artificial de factores de virulencia, usando los genes de la subunidad beta de la RNA polimerasa como controles positivos, ya que estos genes forman parte de la base de datos.

El ensamblaje de las secuencias se realizó usando Genomic Workbench 3 y se comparó el genoma *in silico* de genes de virulencia vs el genoma de las cepas 7746, 7747, *Streptococcus salivarius* CCHSS3 y *Lactobacillus casei* ATCC 334.

#### 2.4.2 Presencia de elementos móviles

Para identificar si las cepas 7746 y 7747 contenían en sus genomas plásmidos caracterizados, se realizó una búsqueda de plásmidos encontrados en el género *Streptococcus* usando la base de datos NCBI <http://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/>, encontrando 7 plásmidos asociados a estreptococos, en concreto 1 de *S. gallolyticus*, 1 de *S. infantarius*, 1 de *S. macedonicus*, 1 de *S. pseudopneumoniae*, 1 de *S. suis* y 2 de *S. thermophilus*. Los datos fueron obtenidos en formato FASTA y se realizó un BLAST comparativo entre

los plásmidos encontrados y las cepas 7746 y 7747, considerando un hit positivo si tenía un E-value  $< 10^{-5}$  y una identidad de secuencia superior al 50% sobre al menos 100 nt.

## 2.5 Presencia en individuos sanos

Se estudió la prevalencia de *Streptococcus dentisani* *sp.nov* y *Streptococcus salivarius* en la placa dental de pacientes sanos mediante la comparación de las secuencias de ADN de los genomas de las cepas 7746-7747 y *S. salivarius* DSM 20560, frente a 118 metagenomas de placa dental, disponibles por el Consorcio Internacional del Microbioma Humano (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

La comparación se realizó mediante el programa MUMmer (Kurtz *et al.*, 2004), que permite la alineación rápida del genoma ya sea de forma global o incompleta, siguiendo la metodología de (Belda-Ferre *et al.*, 2011). Los reclutamientos de las secuencias permitieron cuantificar la presencia de las cepas en los metagenomas de pacientes sin caries dental. Aquellas lecturas metagenómicas individuales que mostraban coincidencias por encima de un umbral característico de identidad frente a los genomas de referencia, fueron reclutadas para trazar un gráfico que varió en densidad dependiendo de la abundancia de las cepas en la muestra. En este caso se consideró que *S.dentisani* estaba presente en la muestra si al menos 20 secuencias del metagenoma mostraban una similitud del 99% o superior en comparación con el genoma de cada una de las cepas.

## 2.6 Presencia en individuos de diversas localizaciones geográficas

Para identificar si *S. dentisani* se encontraba presente en diversos orígenes geográficos usamos bases de datos públicas o cedidas cordialmente para nuestros análisis. Obteniendo secuencias cortas y largas para el gen 16S rRNA, a partir de muestras como saliva, placa dental, placa supragingival y placa subgingival.

La presencia de *S. dentisani* fue testada usando BLASTn, mediante comparación del gen 16S de *S. dentisani* 7746 y 7747, enfrentándolas a secuencias obtenidas de 16S rRNA de áreas geográficas como: África, Alaska, Alemania, África, China, Estados Unidos, Japón, y Puerto Rico en análisis por separado. Se consideraron como positivos todo aquellos hits con una similitud >97% y un 90% de cobertura para el gen 16S rRNA en cada uno de los casos.

### SECUENCIAS CORTAS 16S rRNA

#### Alaska

En el estado de Alaska (EU), se tomaron muestras de saliva a 76 individuos nativos, pertenecientes a 4 poblaciones diferentes; Atkasuk (14 muestras), Barrow (40 muestras), Nuiqsut (13 muestras) y Wainwright (9 muestras).

Se reclutaron voluntarios con edades entre los 20 y 40 años y cada uno de ellos recolectó hasta 2 ml de saliva en tubos que contenían 2 ml de tampón de lisis. Los archivos fasta obtenidos formaban parte del estudio de Li J *et al.*, 2014.

#### Alemania

En Alemania, las muestras fueron recolectadas de individuos que vivían en Leipzig o sus alrededores. Este grupo de voluntarios, forman parte del estudio citado en el párrafo anterior. Por ello, para este grupo de muestras, se cumplen los mismos criterios de inclusión de voluntarios, materiales y métodos.

### **África**

Se tomaron muestras de saliva de pigmeos Batwa de las comunidades Mpungo, Mukongoro, Kitariro, Nyakatare y Bikuto en Uganda. De personas de la República Democrática del Congo (RDC) e individuos de Freetown (Sierra Leona). Las muestras pertenecían al estudio de Nasidze *et al.*, 2011.

## **SECUENCIAS LARGAS 16S rRNA**

### **Alemania**

Se recogieron muestras de placa de supra y submucosa y supra y subgingival, y se usaron 2 puntas de papel estéril (VDW GmbH, Múnich, Alemania), por vía supramucosa o supragingival para recoger los biofilms. Otras dos puntas de papel estéril se colocaron en submucosa o subgingivalmente. Las muestras formaban parte del estudio de Schaumann *et al.*, 2014.

### **China**

Diez niños menores de 30 meses de edad con caries dental, fueron reclutados y el grupo control lo conformaban nueve niños, sin lesiones por caries. Para cada niño, la muestra de placa dental fue tomada del esmalte intacto. Las muestras se recogieron, mediante una cuchara de excavación estéril y se colocaron inmediatamente en un tubo eppendorf, que contenía 1 ml de solución de tiosulfato sódico. Los resultados obtenidos forman parte del trabajo de Xu *et al.*, 2014.

### **Estados Unidos**

Los sujetos reclutados tenían 4 afiliaciones étnicas distintas: negros no hispánicos (africanos americanos), blancos no hispánicos (caucásicos), chinos y latinos. La saliva fue recolectada por expectoración en un tubo estéril, como describió (Navazesh M., 1993). La placa supragingival fue recolectada, mediante la inserción de puntas de papel en el surco gingival interproximal de 10 dientes,

seleccionados al azar. Los resultados de pirosecuenciación son parte del estudio de Mason *et al.*, 2013.

### **Japón**

A los individuos reclutados en el estudio se les pidió morder cera de parafina durante 5,5 minutos, y la saliva estimulada producida durante los últimos 5 minutos, se recogió en tubos de plástico estériles. Para recolectar las muestras de placa supragingival, se utilizaron curetas estériles en todas las superficies dentales, en la mandíbula superior que contenía la mayoría de los dientes, utilizando golpes coronales comenzando desde el margen gingival. Las muestras formaban parte del trabajo de Yamanaka W *et al.*, 2012).

### **Puerto Rico**

Para este estudio se reclutaron 44 niños con toma de muestras en la visita inicial y al año de seguimiento. La placa dental se recolectó de todas las superficies dentales disponibles y se reunió en tubos de microcentrífuga previamente pesados. Los resultados obtenidos formaban parte del estudio del grupo de Morou-Bermudez *et al.*, 2015).

## **2.7 Determinación de los niveles de *S. dentisani* en placa dental**

Se seleccionaron dos voluntarios sanos varones de 20 a 30 años, no fumadores, con 28 dientes, excluyendo los terceros molares, con buena salud dental y periodontal: con ausencia de caries (nivel no cavitado), DMF = 0, OHI = 0, GI = 1, y CPI = 1 (siguiendo la nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud [OMS], 1997). Los sujetos fueron denominados como MG01 y MG02, no habían sido tratados con antibióticos en los últimos 6 meses antes de la toma de muestras, ni presentaron antecedentes de uso rutinario de antisépticos orales.

Se tomaron muestras de placa dental supragingival de superficies vestibulares (bucales) y linguales (palatinas) de cada uno de los 28 dientes en cada voluntario.

La cuantificación de *S. dentisani* se realizó en superficies libres individuales de cada tipo de diente (incisivo, canino, premolar y molar) a partir de un cuadrante y los números absolutos se calcularon multiplicando el valor obtenido, por el número de cada tipo de diente en la boca. Se siguió el mismo procedimiento para la cuantificación del contenido bacteriano total.

Las muestras de placa dental se resuspendieron en 100 µl de tampón PBS y el ADN se extrajo con el instrumento MagnaPure LC JE379 y el kit de aislamiento de ADN MagnaPure LC (Roche). La cuantificación del ADN se realizó con el kit dsDNA Quant-iT PicoGreen (Invitrogen), y se realizó una PCR en tiempo real usando un LightCycler 480 con la master mix LightCycler 480 SYBR Green I (Roche). En cada uno de los pasos, se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Los primers específicos para la cuantificación de *S. dentisani* se dirigieron frente a los genes:

- Carbamato Quinasa (*arcC*): CkSdF (5'-GTAACCAACCGCCCAGAAGG-3') y  
CkSdR (5'-CCGCTTTCGGACTCGATCA-3')
- ORF540: Orf540F (5'-ATGTTTCATCGGCTT\*TGACAGGCTT-3') y  
Orf540R (5'-TAAGCAAGCATAGAACCGCGCC-3').

La especificidad de los primers fue predicha *in silico* usando la herramienta primerBLAST implementada en la NCBI y fue confirmada en otros streptococos por la ausencia de amplificación por PCR (35 ciclos), tras usar 5 ng/µl de ADN de las cepas *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. pneumoniae*, *S. infantis* y *S. oralis*. La especificidad de los primers también se verificó tras examinar los perfiles de melting después de cada ensayo. Los primers para el gen de la carbamato quinasa no amplificaron ninguna de las especies de *Streptococcus* probadas, mientras que los primers para el ORF540

amplificaron solo el ADN de *S. pneumoniae*, que no es un habitante común en la placa dental. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenía 1 µl de ADN (en concentraciones de 5 a 22 ng/µl), 10 µl de la master mix LightCycler 480 SYBR Green I, 0.4 µl de cada cebador y 7.2 µl de agua libre de nucleasas. El protocolo de amplificación fue el siguiente: un paso inicial de 95 °C durante 5 min, y 40 ciclos de 10s a 95°C, 20s a 65°C y 25s a 72°C. Todas las cuantificaciones se realizaron por duplicado.

La concentración de *S. dentisani* en cada una de las muestras se calculó por comparación con los valores de Cq obtenidos de una curva estándar. Esta curva se realizó utilizando diluciones seriadas (10 veces) del ADN extraído de  $2 \times 10^7$  UFC/ml (contabilizadas en placas de agar mediante diluciones en serie). Finalmente, los valores de Cq obtenidos en las muestras de placa dental se reemplazaron en la ecuación estándar y se expresaron en números absolutos por tipo de diente analizado.

## 2.8 Tests de inhibición (difusión en agar)

Para las pruebas de difusión en agar o método de cilindro-placa, se usó como medio base TSA y como bacteria indicadora la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Esta cepa se cultivó en 10 ml de caldo ICC a 37°C, durante 24 horas en aerobiosis. Al mismo tiempo, se cultivaron los aislados potencialmente productores en 10 mL de caldo ICC a 37°C, durante 24 horas en aerobiosis. Al término de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm durante 25 minutos a 4 °C, recuperando los sobrenadantes y descartando el pellet. A su vez, se fundieron en un baño a 60 °C tubos que contenían 7 ml de agar TSA al 0,7% de agar (agar blando) y se mantuvieron en estado líquido hasta su utilización.

En la cabina de flujo laminar, se dispusieron entre 5 y 8 cilindros de acero inoxidable previamente esterilizados sobre placas Petri conteniendo el medio

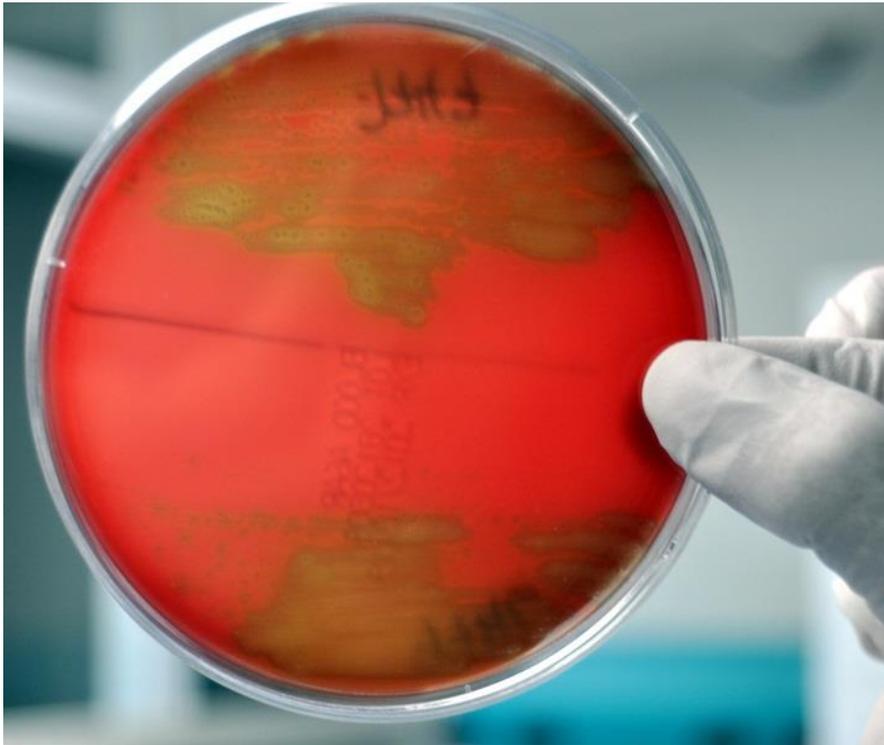
base (TSA). Se adicionaron 200 µl del inóculo de *S. mutans* a los tubos que contenían los 7 ml de agar blando, se homogeneizó mediante mezcla ligera con vórtex y se vertió en forma de doble capa sobre la placa base con los discos de acero, teniendo la precaución de no moverlos. Una vez solidificada la doble capa, se eliminaron uno a uno todos los discos de acero con ayuda de pinzas estériles. De esta manera, se obtuvieron unos pocillos en la placa en los que se depositaron 100 µl de los sobrenadantes obtenidos de las cepas productoras. Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 37°C, durante 24 horas. Al final del período de incubación, se visualizaron las placas para detectar los posibles halos de inhibición.

A la vez que se testaron los sobrenadantes de las cepas *S. dentisani* 7746 y 7747 y con el fin de comparar la capacidad inhibitoria de los aislados, se probó también la cepa patentada *S. salivarius* M18 o anteriormente denominada Mia (Heng *et al.*, 2011). Con este fin, también probamos la inhibición producida utilizando como medio de cultivo agar TSBCaYE, que contenía Caldo soja y tripticaseína, Agar Davis (1.5%), Carbonato de calcio (0.25%) y Extracto de levadura (2%).

### 3. RESULTADOS

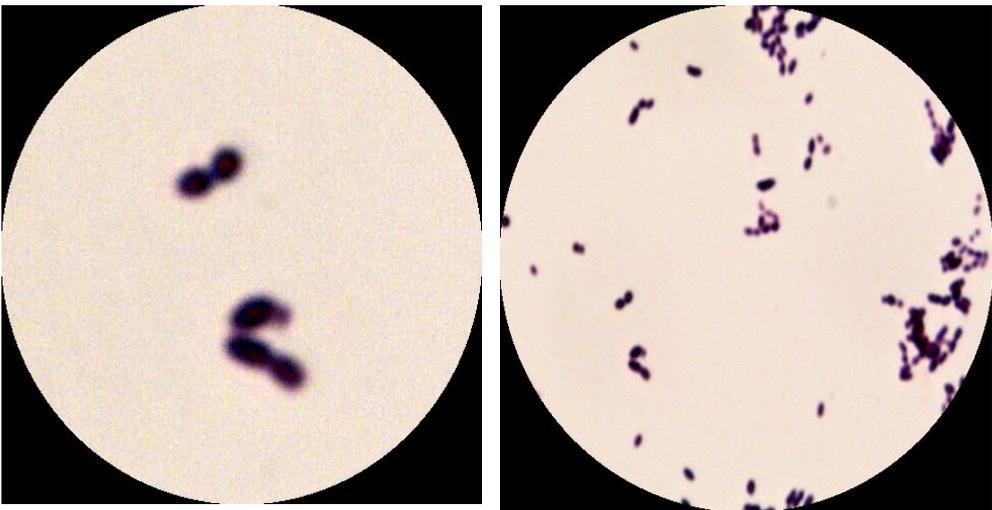
#### 3.1 Características macroscópicas y microscópicas de las cepas

En agar sangre enriquecido con sangre de carnero y agar infusión cerebro corazón se obtuvieron colonias blancas, redondas, viscosas, pequeñas con un tamaño promedio de 1.5 mm de diámetro, que presentaban bordes irregulares y hemólisis alfa (Figura 1.1). Al observar las células al microscopio se observaban cocos Gram positivos, dispuestos en pares o cadenas (Figura 1.2). Resultaron ser anaerobios facultativos, ya que pueden crecer tanto en presencia de oxígeno como en ausencia del mismo.



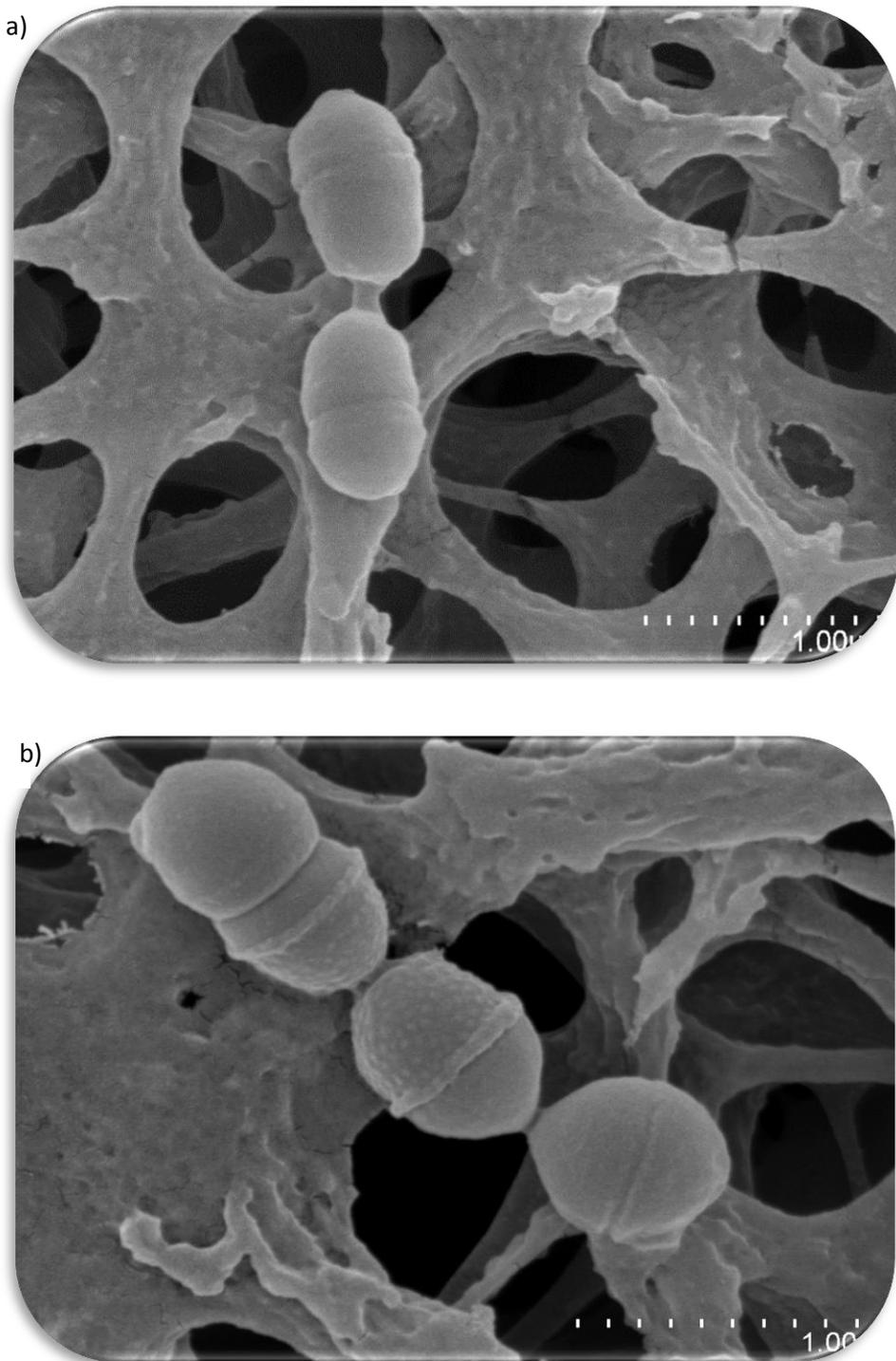
**Figura 1.1.** Hemólisis alfa producida por las cepas 7747 (siembra superior) y 7746 (siembra inferior) de *Streptococcus dentisani* sp. nov en agar sangre suplementado.

Las cepas de *Streptococcus dentisani* sp. nov resultaron ser Gram positivas, lo que significa que poseen una gruesa capa de peptidoglicano rodeando su membrana citoplasmática. Dicho compuesto es de vital importancia para conservar la forma, darle rigidez a la célula bacteriana y es el encargado de retener el cristal violeta durante la coloración de Gram, de ahí que al realizar la tinción las células tomen una coloración azul oscura o violeta (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Morfología microscópica100X de *Streptococcus dentisani* sp. nov.

Gracias a la visualización con el microscopio electrónico de barrido con cañón de emisión de campo (FEG), resolución de 1.4nm a 1kV y aumento de 30,000X en modo HM, pudimos observar las características microscópicas de las cepas a una escala de aumento superior, comprobando que ambas tienen una disposición en pares o cadenas cortas (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Morfología de *Streptococcus dentisani* sp.nov 7746(a) y 7747(b), observada con microscopía electrónica y aumento de 30,000X HM.

## 3.2 Características bioquímicas de las cepas

### 3.2.1 Pruebas de Catalasa y Oxidasa

Las pruebas de catalasa y oxidasa mediante el uso de peróxido de hidrogeno y oxalato de dimetil-para-fenilendiamina fueron negativas, al no observarse producción de burbujas, ni cambio de coloración respectivamente.

### 3.2.2 Pruebas bioquímicas mediante galerías API

En la Tabla 1.1 se observan las pruebas bioquímicas que difieren significativamente entre las cepas testadas. Estas pruebas fueron discriminatorias, puesto que los perfiles bioquímicos de la cepas 7746 y 7747 resultaron diferentes a los de *Streptococcus mitis* ATCC 49465, *Streptococcus oralis* ATCC 35037, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 y *Streptococcus infantis* JCM 1015. Estos datos, junto con el cálculo del ANI, nos permitieron considerar que se trataba de especies diferentes.

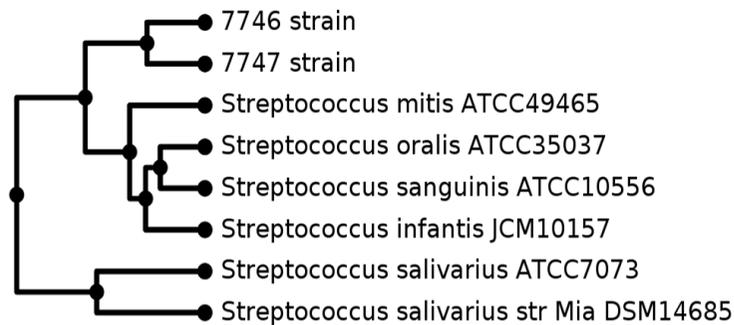
En cuanto al perfil bioquímico particular de las cepas de *Streptococcus dentisani* *sp.nov* (7746-7747), se puede concluir que son fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa, maltosa y lactosa positivas, representando esta última una característica favorable si lo que se pretende es crear un alimento funcional adicionando este tipo de microorganismo a derivados lácteos.

**Tabla 1.1** Características bioquímicas que difieren entre las cepas de *Streptococcus dentisani* sp. nov., otras especies del grupo viridans y una cepa patentada anticaries. **C:** determinado con el kit API50CH, **S:** determinado con el kit API20Strep, Reacciones: **(-)** negativo; **(+)** positivo; **(v)** variable

Método usado	7746	7747	<i>S.mitis</i> ATCC 49465	<i>S.oralis</i> ATCC 35037	<i>S.sanguinis</i> ATCC1 0556	<i>S.salivarius</i> ATCC 7073	<i>S.infantis</i> JCM 10157	<i>S.salivarius</i> Str Mia DSM 14685
Adificación de: <b>Amigdalina (C)</b>	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Arbutina (C)</b>	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Inulina (C,S)</b>	-	-	-	-	v	-	-	v
<b>Lactosa (C,S)</b>	+	+	+	+	v	-	+	+
<b>Maltosa (C)</b>	-	+	+	+	+	+	v	+
<b>Rafinosa (C,S)</b>	v	v	+	-	-	v	-	v
<b>Ribosa (C,S)</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>Almidon (C,S)</b>	-	-	-	-	-	v	-	-
<b>Trehalosa (C,S)</b>	-	-	-	+	v	+	-	+
Producción de: <b><math>\alpha</math>-Galactosidasa (S)</b>	v	v	-	-	-	-	-	-
<b>Fosfatasa alcalina (S)</b>	+	v	-	+	-	-	-	-
<b>Reaccion-VP (S)</b>	-	-	-	-	-	+	-	+
Hidrólisis de: <b>Beta-glucosidasa- Esculina (C,S)</b>	-	-	-	-	v	v	-	+
<b>Acido hipúrico (S)</b>	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>Galactosa (C)</b>	-	v	+	+	+	-	+	+
<b>Glucosa (C)</b>	-	-	+	+	+	-	+	+
<b>Fructosa (C)</b>	v	v	+	+	+	-	+	+
<b>Manosa (C)</b>	-	v	v	+	+	-	+	+
<b>Metil- <math>\beta</math>D-xilopiranosida (C)</b>	-	-	+	+	+	-	+	+
<b>Celobiosa (C)</b>	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Sacarosa (sucrosa) (C)</b>	-	v	+	+	+	-	+	+
<b>Gentiobiosa (C)</b>	-	-	-	-	-	+	-	+

### 3.2.3 Dendrograma API®

En la Figura 1.4 se muestra el dendrograma obtenido a partir de las reacciones bioquímicas de las cepas estudiadas. Se observa claramente cómo las cepas de *Streptococcus dentisani* sp.nov (7746-7747) son muy cercanas entre sí, formando un cluster que se diferencia claramente de las otras cepas testadas. Asimismo, se puede apreciar que las cepas de *Streptococcus dentisani* sp. nov provienen de un género que es común para las demás especies testadas.



**Figura 1.4.** Dendrograma obtenido a partir de los resultados obtenidos en los ensayos realizados por medio de galerías API®

### 3.3 Análisis filogenéticos y genómicos

Después de la secuenciación y el ensamblado *de novo* de los genomas de las cepas de *S. dentisani* 7746 y 7747, se obtuvieron borradores de genomas de 1.981.087 y 1.884.389 nucleótidos (nt), respectivamente. El contenido de G+C en el ADN en ambas cepas fue de 40.8 mol%, siendo muy similar al contenido de especies cercanas del grupo mitis, del género *Streptococcus* (Kawamura *et al.*, 1998).

Los valores de ANI<sub>b</sub> y ANI<sub>m</sub> obtenidos tras las comparaciones con más de 130 borradores o genomas completos se listan en la Tabla 1.2. Los valores más altos de ANI<sub>b</sub> y ANI<sub>m</sub> se obtuvieron al alinear los genomas de las cepas de *S. dentisani* con los genomas de las especies pertenecientes al grupo mitis. En

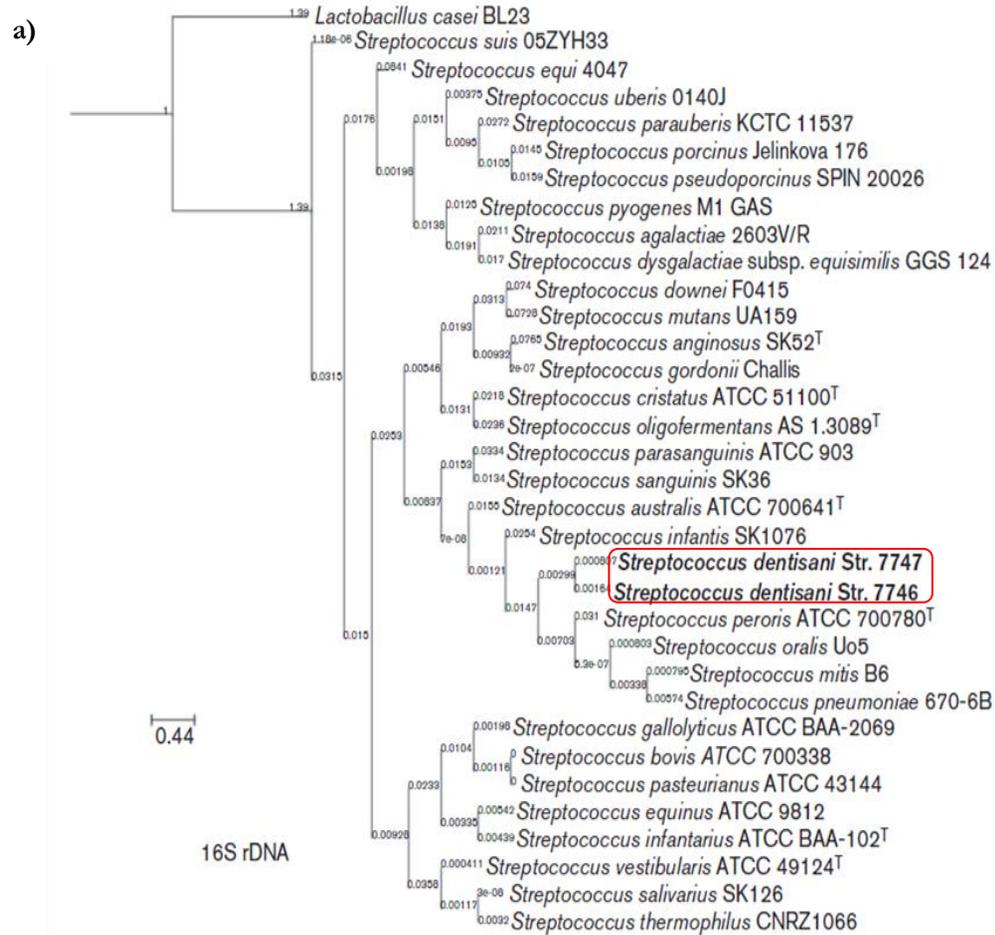
particular, las cepas de *S.dentisani* 7746 y 7747 muestran valores de ANI elevados (ANIb: 91% y ANIm: 92% para ambas cepas) cuando se comparan con la cepa de *Streptococcus oralis* (Tabla 1.2). No obstante, los valores de ANI obtenidos de todas las comparaciones están por debajo del límite trazado para delimitar especies (Konstantinidis and Tiedje, 2005), aun usando comparaciones conservadoras como las realizadas usando el alineamiento MUMmer, y permiten proponerlas como una nueva especie procariota (Goris *et al.*, 2007; Richter and Rosselló -Mora, 2009). Por otro lado, la comparación entre las dos cepas de *S. dentisani* 7746 y 7747, muestra valores ANI de 94%, lo que permite considerarlas dos aislados diferentes de la especie *S. dentisani sp.nov.*

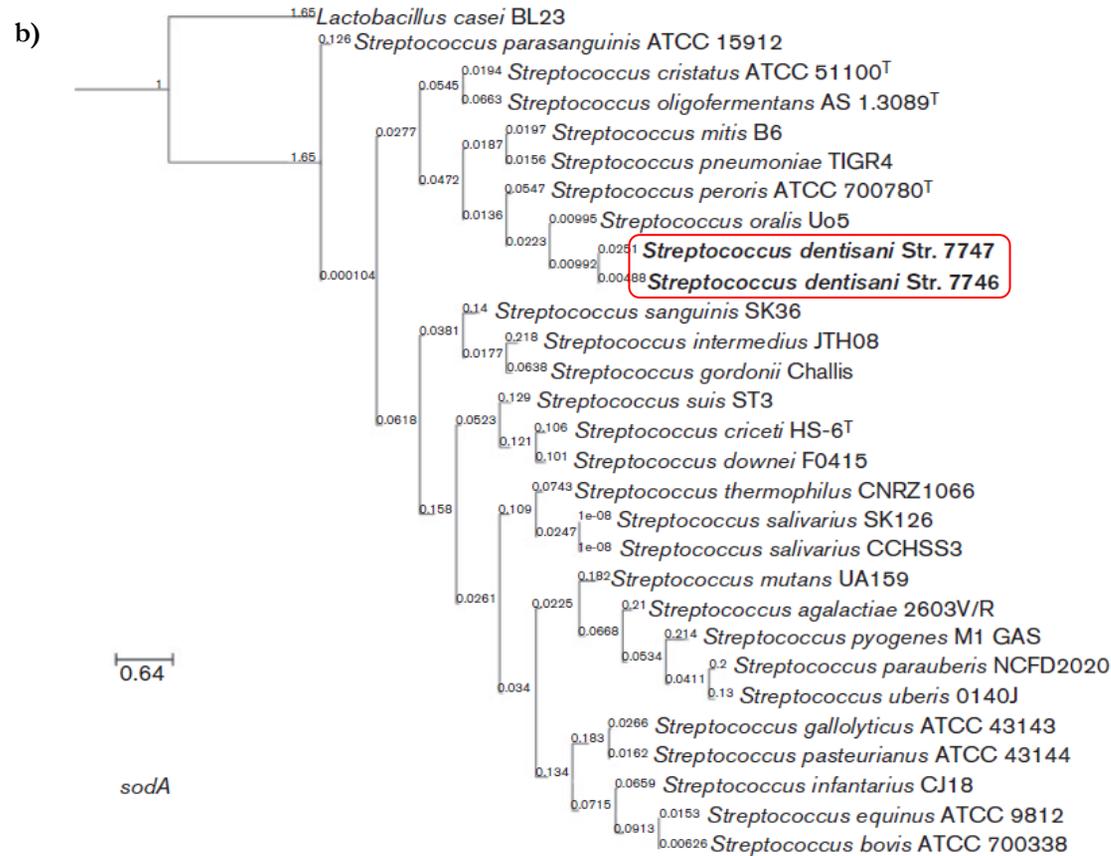
Al realizar el árbol filogenético con las secuencias de los genes ribosómicos 16S y *sodA* las dos cepas de *S. dentisani* se agruparon con especies del grupo mitis (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae* y *S. peroris*; Figura 1.5a y 1.5b), pero dado el bajo grado de variabilidad para este gen en los miembros del grupo mitis, se realizó la reconstrucción de árboles adicionales con la longitud total de las secuencias concatenadas de los genes 16S y 23S rRNA (Figura 1.6), conteniendo más de dos veces el número de sitios informativos. Estos árboles muestran la mismas relaciones filogenéticas, donde las cepas 7746 y 7747 se agrupan juntas y se identifican como especies cercanas *S.oralis*, *S.mitis*, *S.pneumoniae* y *S.peroris*.

**Tabla 1.2. Análisis de la identidad nucleotídica media (ANI),** entre las cepas de *Streptococcus dentisani* sp.nov y especies del género *Streptococcus* cuyas secuencias estaban disponibles en bases de datos de acceso libre.

Cepas: 1, Str.7746; 2, Str. 7747. Los valores de ANIb corresponden al análisis ANI usando la herramienta BLAST para alinear secuencias, los valores de ANIm representan los valores obtenidos con la herramienta MUMmer. Cuando los valores de ANI son obtenidos para diferentes cepas cercanas de las mismas especies, se reportó el valor medio de ANI.

Strain for comparison	ANIb (%)		ANIm (%)	
	1	2	1	2
<i>Streptococcus dentisani</i> Str. 7746	100	94	100	94
<i>Streptococcus dentisani</i> Str. 7747T	94	100	94	100
<i>Streptococcus oralis</i>	91	91	92	92
<i>Streptococcus mitis</i>	87	87	90	90
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	86	86	88	88
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	85	85	88	88
<i>Streptococcus infantis</i>	81	81	86	86
<i>Streptococcus peroris</i>	81	81	86	86
<i>Streptococcus oligofermentans</i>	75	75	88	88
<i>Streptococcus cristatus</i>	75	75	89	89
<i>Streptococcus sanguinis</i>	75	75	87	88
<i>Streptococcus gordonii</i>	75	74	88	88
<i>Streptococcus australis</i>	74	75	87	88
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	74	74	87	87
<i>Streptococcus intermedius</i>	73	73	86	86
<i>Streptococcus constellatus</i>	73	73	86	86
<i>Streptococcus anginosus</i>	73	73	86	86
<i>Streptococcus salivarius</i>	72	72	87	86
<i>Streptococcus infantarius</i>	71	71	86	86
<i>Streptococcus suis</i>	71	71	85	85
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	71	71	85	86
<i>Streptococcus equinus</i>	71	71	86	86
<i>Streptococcus pyogenes</i>	71	70	86	86
<i>Streptococcus galloyticus</i>	71	71	86	86
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	70	70	86	86
<i>Streptococcus mutans</i>	70	70	85	85
<i>Streptococcus downei</i>	70	70	86	87
<i>Streptococcus agalactiae</i>	70	70	85	85
<i>Streptococcus uberis</i>	70	70	87	86
<i>Streptococcus equi</i>	70	70	85	85





**Figura 1.5.** Árboles filogenéticos basados en secuencias de la longitud total del gen **a)** 16S rRNA y **b)** superóxido dismutasa dependiente de Mn (*sodA*). Los valores en las barras de escala, corresponden a las distancias genéticas basadas en el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

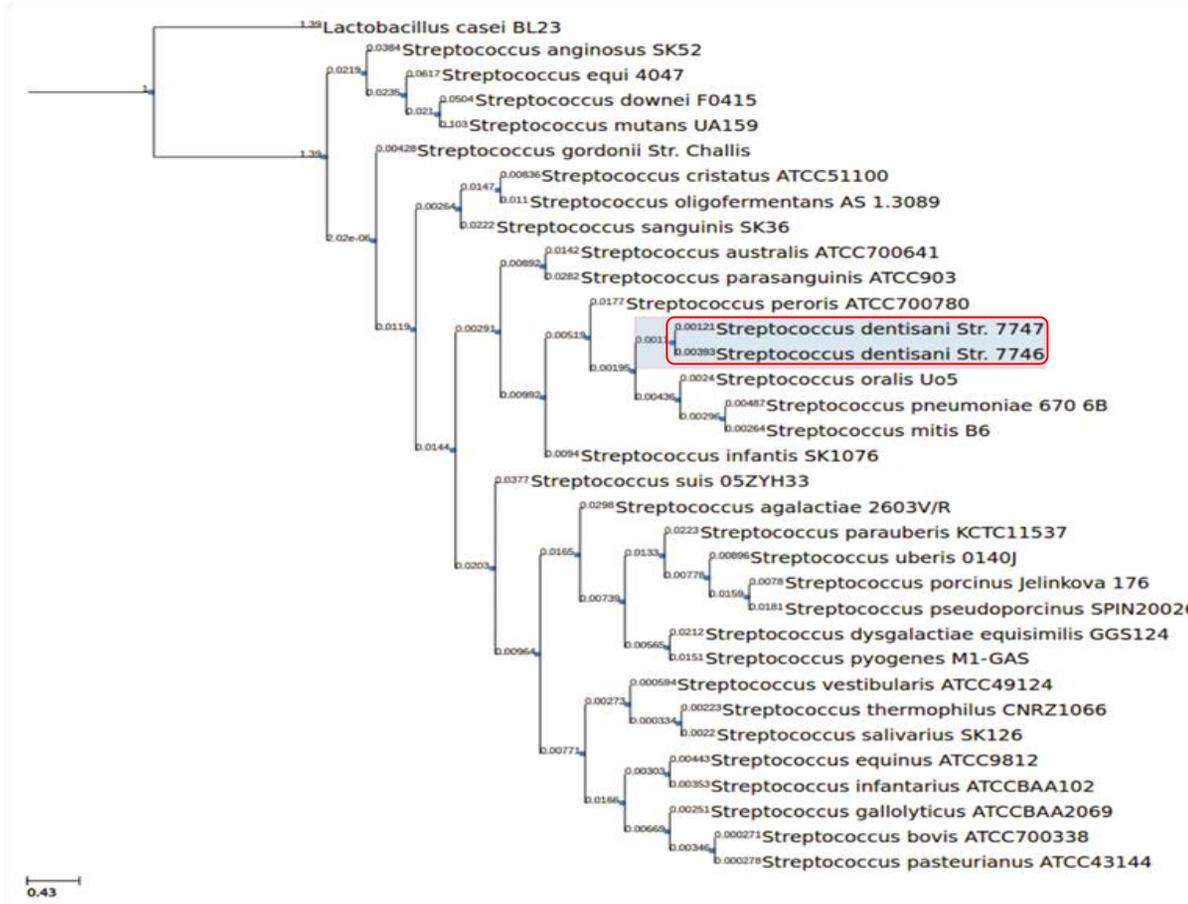


Figura 1.6. Árbol filogenético basado en secuencias con la longitud total de los genes 16S y 23S rRNA concatenados.

### 3.4 Caracterización genómica

#### 3.4.1 Genes de virulencia

Para las cepas 7746 y 7747 se asociaron 9 y 19 genes de virulencia, respectivamente. Los genes compartidos por las cepas 7746 y 7747 fueron HlyB - Hemolysin B [*Escherichia coli* CFT073], Iga - inmunoglobulin A1 protease [*Streptococcus pneumoniae*], lmb - laminin-binding surface protein [*Streptococcus agalactiae* 2603V/R], NagH - hyaluronidase [*Clostridium perfringens* 13], NanA - Sialidase A precursor (neuraminidase A) [*Streptococcus pneumoniae* R6] y PavA - adherence and virulence protein A [*Streptococcus agalactiae* 2603V/R]. Las cepas de *Streptococcus dentisani* comparten con *Streptococcus salivarius* CCHSS3 los genes de virulencia HlyB - Hemolysin B [*Escherichia coli* CFT073], Iga - inmunoglobulin A1 protease [*Streptococcus pneumoniae*] y pavA - adherence and virulence protein A [*Streptococcus agalactiae* 2603V/R] y con *Lactobacillus casei* ATCC 334 el gen de virulencia HlyB - Hemolysin B [*Escherichia coli* CFT073]. Este hecho es fundamental puesto que para que un probiótico sea efectivo contra la caries debe adherirse y crecer sobre el diente, que es el sitio donde tiene lugar la enfermedad.

Las cepas estudiadas no parecen tener genes de virulencia con implicaciones en seguridad. Hay que tener en cuenta que el hecho de que algunos de estos genes se hayan asociado a virulencia en algunas cepas no implica que realmente causen enfermedad, pues en muchos casos se trata de genes esenciales que permiten la vida en nichos de hospedadores, y son genes detectados tanto en especies patógenas como comensales. Un caso de especial relevancia sería la identificación de genes codificantes para toxinas, los cuales no han sido encontrados en ninguno de los dos genomas. Por último, destacar que los genomas de las cepas 7746 y 7747 no están cerrados, por lo que no se puede descartar la presencia de otros genes de virulencia en las mismas. En cualquier

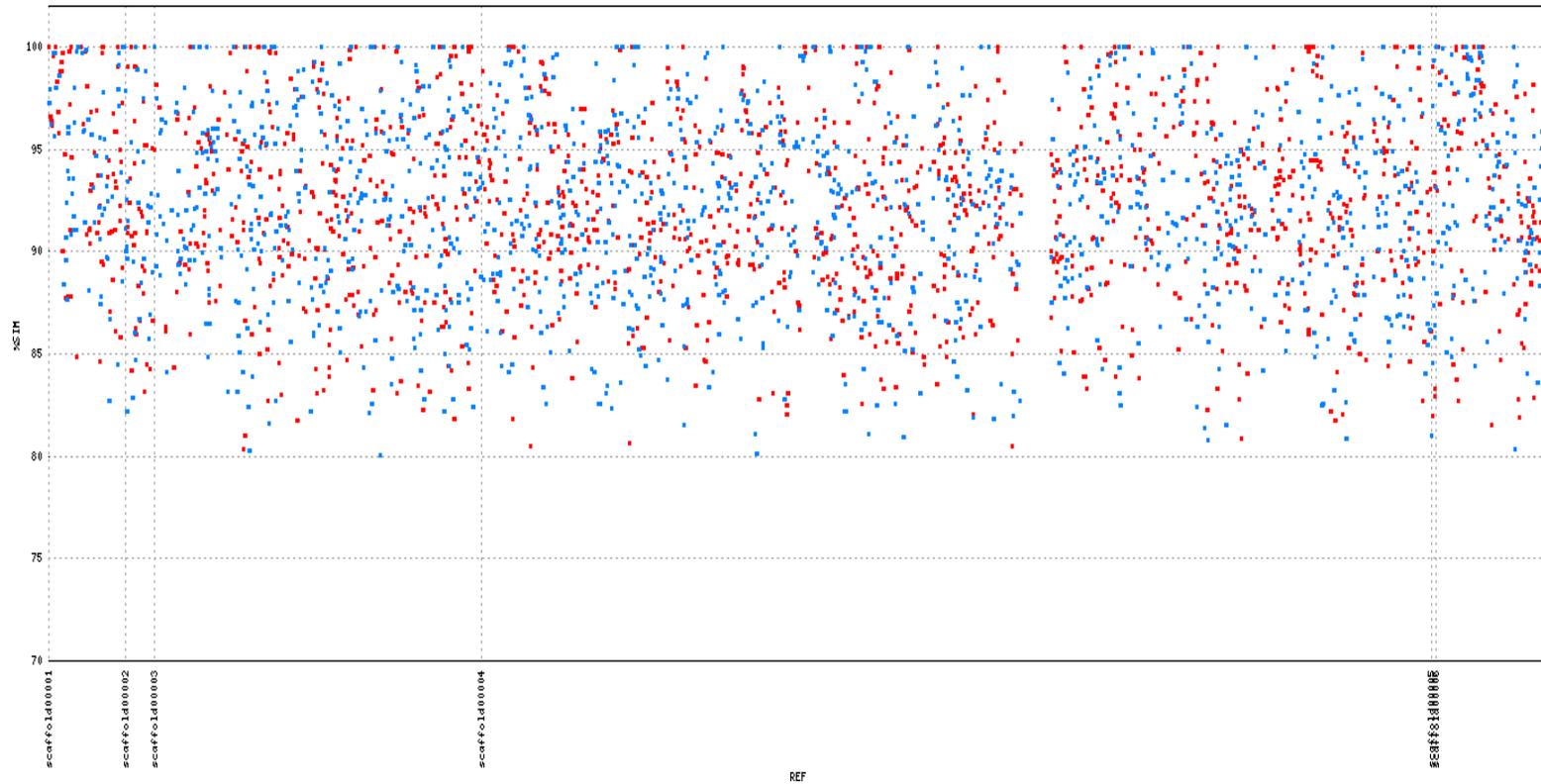
caso, esto es improbable dado el nivel de cobertura en la secuenciación del genoma (20x), que hace probable que las zonas no cubiertas por la secuenciación no correspondan a genes sino a regiones de ADN repetido donde los algoritmos de ensamblado se interrumpen.

### 3.4.2 [Presencia de elementos móviles](#)

La búsqueda por BLAST de los genomas de las cepas 7746 y 7747 frente a los 7 plásmidos de estreptococos presentes en las bases de datos dieron un único hit positivo, correspondiendo al mismo gen en ambas cepas. Se trata de una región de 222 pb en la cepa 7746 ( $E\text{-value} = 5e\text{-}34$ ) y de 131 pb en la cepa 7747 ( $E\text{-value} = 5e\text{-}25$ ). Ambas regiones mostraron un porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos del 83 y 86% respectivamente frente a un dominio UvrD-helicasa de 2111 pb, que forma parte de la proteína *rexA* con actividad exonucleasa, de 3683 pb de longitud. Por tanto, el hit se corresponde con una porción mínima de este gen, que además no es un gen plasmídico como tal. Por todo ello, concluimos que no se encuentran regiones plasmídicas en los genomas de las cepas 7746 y 7747.

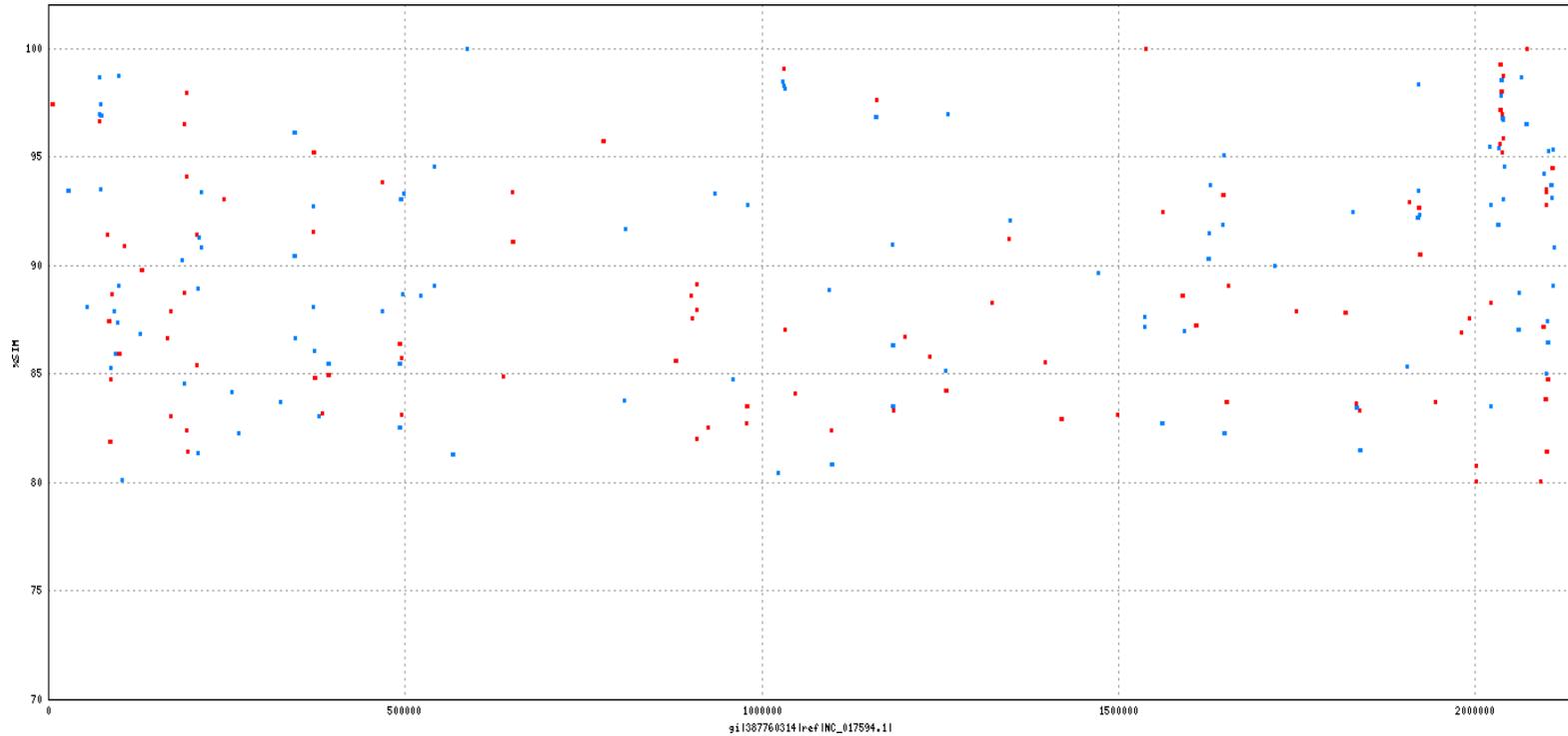
### 3.5 Presencia en individuos sanos

El análisis mediante reclutamiento de secuencias demostró que la cepa 7746 se encontraba presente en 116 de los 118 individuos sanos, mientras que la cepa 7747 se encontraba en el metagenoma de la placa dental de los 118 individuos sanos disponibles en el HMP. Por el contrario, *S. salivarius* se encontró en tan sólo 3 de los 118 individuos. A modo de ejemplos, en las *Figuras 1.7* y *1.8* se muestran los reclutamientos obtenidos para *S. dentisani* 7747 y *S. salivarius* frente a individuos sanos incluidos en la base de datos HMP.



**Figura 1.7. Resultados de reclutamiento para la cepa 7747 frente al metagenoma del individuo SRS023964.**

El eje X muestra la posición de los genes en los cinco fragmentos del genoma secuenciados, y el eje Y el grado de similitud a nivel de ADN entre esos genes y los fragmentos de uno de los metagenomas orales de individuos sanos del proyecto Microbioma Humano. Se puede observar una alta cobertura de puntos, muchos de los cuales están a una similitud >98%. El eje X se corresponde con la posición en los contigs del genoma, y en el eje Y se observa la similitud de secuencia de ADN (%)



**Figura 1.8. Resultados de reclutamiento para la cepa de *Streptococcus salivarius* frente al metagenoma del individuo SRS023938.**

El eje X muestra la posición de los genes en el genoma secuenciado de *S. salivarius*, y el eje Y el grado de similitud a nivel de ADN entre esos genes y los fragmentos de uno de los metagenomas orales de individuos sanos del proyecto Microbiome Humano. Se puede observar una baja cobertura de puntos, y la casi total ausencia de genes a una similitud >98%. Los puntos rojos y azules se refieren a genes en sentido directo o inverso (hebra + ó - del genoma).

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que *S. salivarius* no se encuentra de forma natural en la placa dental. De hecho, es usual que colonice tracto respiratorio superior y zonas blandas de la boca, como la mucosa pero no las superficies dentales (Horz *et al.*, 2007; Power *et al.*, 2008). Respecto a *S. dentisani*, los resultados sugieren que es una bacteria comensal, presente de forma habitual en pacientes sanos, y que parece formar parte de la microbiota autóctona oral. Esta característica fue muy importante para el desarrollo de la cepa probiótica, ya que por un lado disminuye considerablemente las probabilidades de que sea nociva para la salud humana, y por otro, garantiza la colonización del nicho en el que tiene que ejercer su acción beneficiosa.

### 3.6 Distribución geográfica de *S. dentisani* a nivel global

La comparación de las secuencias del gen 16S rRNA de *S. dentisani* 7746 y 7747 frente a las secuencias disponibles provenientes de estudios de secuenciación masiva de dicho gen en muestras de diversos orígenes geográficos muestra que *S. dentisani* se encuentra presente en saliva y placa dental de todos los continentes estudiados, con valores de entre 0,14 y 13,43% de las secuencias analizadas, dependiendo de la localización (Tabla 1.3 a y b).

**Tabla 1.3** Porcentaje de *S. dentisani* en diversas localizaciones geográficas a) Secuencias cortas b) Secuencias largas del gen 16S rRNA

**a) SECUENCIAS CORTAS**

País / Región	Recuento Total de Secuencias	Longitud Mínima	Longitud Máxima	Media	Longitud CORTE (90%)	Nº Hits Dentisani	Tipo de Muestra	Nº de Individuos	% Dentisani
Alaska	20339	150	263	218,72	200	90	Saliva	76	0,55
Alemania	4498	150	284	224,68	200	121	Saliva	10	2,88
Japón	196875	39	756	298,61	268	868	Saliva y Placa Supragingival	19	0,47
República Democrática del Congo	4899	150	249	213,54	200	7	Saliva	20	0,14
Sierra Leona	17611	150	262	215,91	200	34	Saliva	13	0,2
Uganda	23728	150	266	221,56	200	80	Saliva	39	0,38

**b) SECUENCIAS LARGAS**

País / Región	Recuento Total de Secuencias	Longitud Mínima	Longitud Máxima	Media	Primers	Longitud CORTE (90%)	Nº Hits Dentisani	Tipo de Muestra	Nº de Individuos	% Dentisani
Alemania	49317	171	524	504,04	27F-521R	400	5894	Placa supra y submucosa Placa Supra y Sub-gingival	7	11,8
China	376021	8	889	214,76	27F-534R	400	3445	Placa Dental	19	1,49
E.U	2249279	40	1194	389,82		400	140902	Saliva y Placa Supragingival	192	13,43
Puerto Rico	501004	173	631	439,96	357F-926R	400	57838	Placa Supragingival	44	11,4

### 3.7 Determinación de los niveles de *S. dentisani* en la placa dental

Los resultados obtenidos demostraron que ambos individuos tenían valores de abundancia de *S. dentisani* muy similares,  $1.04 \times 10^7$  y  $3.14 \times 10^7$  células para MG01 y MG02, respectivamente, según lo estimado con el uso de los primers para el ORF540. Por otro lado, el valor estimado con los primers para la carboxiltransferasa fue de  $4.46 \times 10^7$  y  $6.94 \times 10^7$  células para MG01 y MG02. Sin embargo, aunque la estimación de *S. dentisani* en la boca de ambos individuos fue muy similar, su distribución fue muy diferente. En la Tabla 1.4 se puede observar, como el individuo MG01 no mostró diferencias importantes en las cantidades de *S. dentisani* entre los diferentes tipos de dientes, ni entre las superficies lingual y vestibular. Sin embargo, el paciente MG02 tuvo una distribución más heterogénea, con proporciones más altas de *S. dentisani* en premolares y molares, y en las superficies linguales de cada tipo de diente.

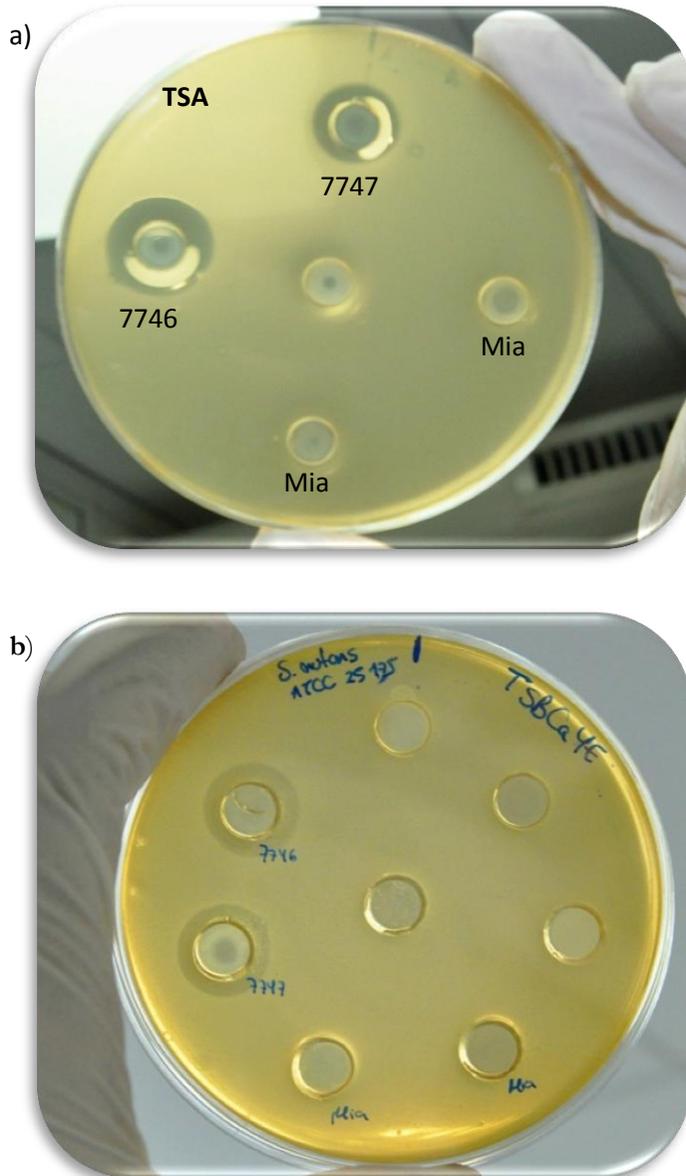
**Tabla 1.4.** Recuentos celulares totales de *S. dentisani* en placa dental supragingival de superficies vestibular (V) y lingual (L) en diferentes tipos de dientes para los individuos sin caries (MG01 y MG02). Los datos muestran las estimaciones de los números de bacterias obtenidos por qPCR con dos conjuntos diferentes de primers (orf540/carboxiltransferasa).

	Incisivo	Canino	Premolar	Molar
<b>MG01 (V)</b>	$2.1 \times 10^5 / 2.8 \times 10^4$	$4.7 \times 10^5 / 7.9 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5 / 3.46 \times 10^4$	$3.1 \times 10^5 / 3.1 \times 10^4$
<b>(L)</b>	$2.8 \times 10^5 / 2.7 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5 / 4.1 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5 / 9.8 \times 10^6$	$4.3 \times 10^5 / 6.9 \times 10^4$
<b>MG02 (V)</b>	$5.5 \times 10^2 / 7.5 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3 / 4.4 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3 / 1.3 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4 / 4.5 \times 10^4$
<b>(L)</b>	$3.4 \times 10^4 / 5.1 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4 / 5.9 \times 10^3$	$7.1 \times 10^4 / 5.0 \times 10^5$	$4.7 \times 10^4 / 1.7 \times 10^7$

### 3.8 Tests de inhibición (difusión en agar)

En los ensayos de difusión en agar o método de cilindro-placa se observó que los sobrenadantes de los aislados potencialmente productores inhibían el crecimiento de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. En la Figura 1.9a y 1.9b, se pueden ver los halos de inhibición producidos por dos de los aislados, posteriormente caracterizados como *Streptococcus dentisani* 7746 y 7747. Asimismo, se puede observar la inhibición producida, en comparación con la cepa de *Streptococcus salivarius* M-18 o también conocida como *Streptococcus Mia* (Chilcott and Tagg, 2007), propuesta como probiótico por su acción frente a

patógenos estreptocócicos, especialmente *Streptococcus mutans*, gracias a mecanismos mediados por sustancias inhibitoras similares a bacteriocinas (Balakrishnan, Simmonds and Tagg, 2001).



**Figura 1.9. Tests de Inhibición.** Difusión en agar con sobrenadantes de dos de los aislados denominados como *S. dentisani* 7746 y 7747, frente a *S. mutans* UA159/ATCC 25175. Se incluye también la cepa *S. salivarius* M18/Mia a) inhibición en medio de cultivo TSA b) inhibición en medio de cultivo TSBCaYE.

## 4. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente capítulo evidencian claramente que, tras las pruebas macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y genómicas de las cepas 7746 y 7747, éstas pueden considerarse como pertenecientes a una nueva especie bacteriana, denominadas por nuestro equipo como “*Streptococcus dentisani* sp.nov”. El nombre original propuesto como *Streptococcus anticariensis* fue rechazado por los revisores de la revista IJSEM al significar “natural de Antequera” en latín (de la antigua ciudad romana de Anticaria), por lo que se propuso y aceptó finalmente el nombre de especie dentisani. Los miembros del grupo mitis son bien conocidos por su diversidad genética intraespecífica (Kilian *et al.*, 2008). Por ello, los estudios realizados basados en análisis filogenéticos de los genes 16S rRNA y *sodA* y los valores de ANIb y ANIm obtenidos nos permiten tener evidencia sólida de las diferencias significativas a nivel genómico, suficientes para considerarlas como una nueva especie dentro del grupo.

Así mismo, podemos definir ciertas características propias de esta especie:

1. Son cocos Gram positivos, dispuestos en pares o cadenas, alfa hemolíticos, anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa negativos.
2. En cuanto a su perfil bioquímico, se caracterizan por ser fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa, maltosa y lactosa positivos. Mediante aproximaciones filogenéticas a partir de los resultados bioquímicos, se puede concluir que se separan claramente de otras especies de *Streptococcus*, siendo, de las testadas, la cepa la *S. mitis* ATCC49465 la más cercana a *S. dentisani* en cuanto a perfil bioquímico se refiere.

3. En los genomas disponibles de las cepas no se han detectado genes de virulencia, ni presencia de elementos móviles que comprometan la seguridad de las mismas al ser suministradas a humanos, aunque hay que tener en cuenta que los genomas no se están completamente cerrados.
4. En cuanto a la seguridad biológica de la nueva especie, se comprobó, por medio de técnicas metagenómicas y de comparación de secuencias del gen 16S, que forma parte de la microbiota normal en la mayoría de humanos sanos, siendo por tanto una especie comensal de la cavidad oral humana.
5. En ensayos de difusión en agar, los sobrenadantes de *S. dentisani* inhiben con mayor efectividad el crecimiento de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175, tras compararlos con otras cepas usadas actualmente como probióticos orales frente a la caries (*Streptococcus Mía*).

Por tanto, los resultados del presente capítulo apoyan que las cepas 7746 y 7747 constituyen una nueva especie, a la que hemos denominado *Streptococcus dentisani* *sp.nov*, la cual proponemos para su uso probiótico, al ser capaz de producir un efecto beneficioso preventivo deseado *in vitro*, siendo además cepas comensales habituales de la microbiota oral humana. En este sentido, los niveles de *S. dentisani* detectados en nuestras estimaciones por qPCR, aunque sólo se realizaron en detalle en dos individuos, y en los porcentajes estimados mediante análisis de las secuencias del gen 16S rRNA disponibles, son congruentes con los números relativos de *S. oralis* ssp. *dentisani* detectados en muestras de saliva por el grupo de Georg Conrads, que fueron entre 0.01 y 10.46% (media 1.73%, mediana 0.13%) (Conrads *et al.*, 2018), así como en los ensayos clínicos posteriores a la redacción de esta tesis por parte de nuestro equipo (datos no publicados). Por tanto, estos resultados nos permiten proponer una dosis total de *S. dentisani*, con el fin de administrarla como probiótico y alcanzar niveles similares a los determinados en la cavidad oral de individuos sin caries.

Estos resultados iniciales fueron la base para la realización de pruebas y experimentos que se describen en capítulos posteriores de la tesis y que principalmente estaban encaminados a caracterizar la función beneficiosa de las cepas, a demostrar la eficacia y seguridad de las mismas para su uso en humanos y a la optimización tecnológica de su producción para su posible explotación como probiótico oral.

Los resultados de este capítulo y la propuesta taxonómica de la nueva especie se recogen en el paper titulado "*Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group" publicado en la revista International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) en enero de 2014 (Camelo-Castillo *et al.*, 2014).

Posterior a este trabajo, el grupo de Mogens Kilian del Departamento de Biomedicina de la Universidad de Aarhus en Dinamarca, hizo un estudio filogenético basado en la tipificación multilocus de secuencias (MLST) usando 8 genes funcionales, el gen 16S rRNA y los genomas completos de 195 *Streptococcus* pertenecientes al grupo mitis (Jensen, Scholz and Kilian, 2016). Donde se demostró nuevamente que las cepas de *S. dentisani* no solamente formaban un cluster filogenético bien diferenciado de otras especies de *Streptococcus*, sino que también se separa de las cepas de *S. mitis* y *S. oralis* (principalmente por su capacidad para hidrolizar la arginina). Sin embargo, en este trabajo proponen reclasificar la cepa como una subespecie de *Streptococcus oralis.*, alegando que dada la alta diversidad de este género y la elevada similitud entre miembros de diversas especies. Los criterios genómicos habituales no son aplicables a *Streptococcus*.

No obstante, no consideramos correcta esta propuesta de clasificación, puesto que se basa solamente en la información obtenida de los arboles filogenéticos,

ignorando los valores que se obtienen de Average Nucleotide Identity (ANI) que demuestran claramente que son una especie diferente y que son el criterio de referencia actual para delimitar especies bacterianas. Así mismo, si se aplicara el mismo criterio que para reclasificar a *S. dentisani* al resto de especies que incluyeron en el estudio, la especie *Streptococcus pneumoniae* debería ser también propuesta como subespecie de *Streptococcus mitis*, lo que en ningún momento se contempla (Jensen, Scholz and Kilian, 2016). Por esta inconsistencia y no aplicación de las normas consenso consideramos que la reclasificación de *S. dentisani* como subespecie de *S. oralis* es arbitraria y no ha lugar. En cualquier caso, la asignación o no como especie no es un factor importante en la aplicación de esta bacteria como probiótico, y hay que recordar además que las características probióticas de una bacteria son cepa-específicas, independientemente de la especie a la que pertenezcan.



## **CAPÍTULO 2**

### **MECANISMOS DE INHIBICIÓN Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS**

---



## 1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos bucodentales tienen una gran importancia en la actualidad, ya que se proponen como una herramienta frente a la prevención y tratamiento de enfermedades orales, sin afectar negativamente la microbiota del nicho e incluso buscando la restauración de la comunidad microbiana en procesos de disbiosis. Pero un factor determinante es la identificación de los mecanismos mediante los cuales estos microorganismos restauran la homeostasis del ecosistema, por ejemplo mediante la producción de un efecto inhibitorio o antimicrobiano sobre algunas especies de patógenos orales.

A lo largo de la evolución las bacterias han tenido que adaptarse al medio donde habitan y para ello han utilizado diferentes estrategias como las mutaciones, la transferencia horizontal de genes, la recombinación o los reordenamientos genómicos, entre otras. De forma tal, que han adquirido una plasticidad y evolución en su genoma que les ha conferido, por ejemplo, la capacidad de resistencia a determinados antibióticos, el desarrollo de patogenicidad (Schmidt and Hensel, 2004) o la capacidad de degradar nuevos compuestos o producir sustancias inhibitorias frente a otras especies cercanas. Esta capacidad inhibitoria puede ser causada por diversas moléculas, tanto de naturaleza peptídica como lipídica, o bien por sustancias como el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una estrategia muy extendida en bacterias orales, que se ha demostrado efectivo en inhibir el crecimiento de importantes patógenos orales como *Streptococcus mutans* (Giacaman *et al.*, 2015) o *Fusobacterium nucleatum* (He *et al.*, 2012). Los trabajos de Jens Kreth, por ejemplo, han mostrado cómo *Streptococcus mutans* y *S. sanguinis* compiten en el medio oral mediante la producción de mutacina y de peróxido de hidrógeno, respectivamente, a los cuales la otra bacteria es sensible (Kreth *et al.*, 2005). Por ello, la presencia inicial

de una u otra bacteria le confiere una ventaja al impedir el crecimiento de su competidora (Mikx *et al.*, 1976; Caufield *et al.*, 2000). En el caso de *S. dentisani*, la naturaleza de la inhibición frente a patógenos orales como *S. mutans*, que fue el motivo inicial de la selección de esta bacteria como probiótico (Belda-Ferre *et al.*, 2012), era desconocida. Por ello, en este capítulo hemos realizado pruebas para determinar si la naturaleza de la inhibición era peptídica o mediada por peróxido de hidrógeno. Este trabajo nos ha llevado a identificar que la inhibición está mediada por péptidos antimicrobianos que aparecen codificados en una región concreta del genoma, formando una “isla” que le confiere a la bacteria una capacidad inhibitoria que vale la pena estudiar en detalle.

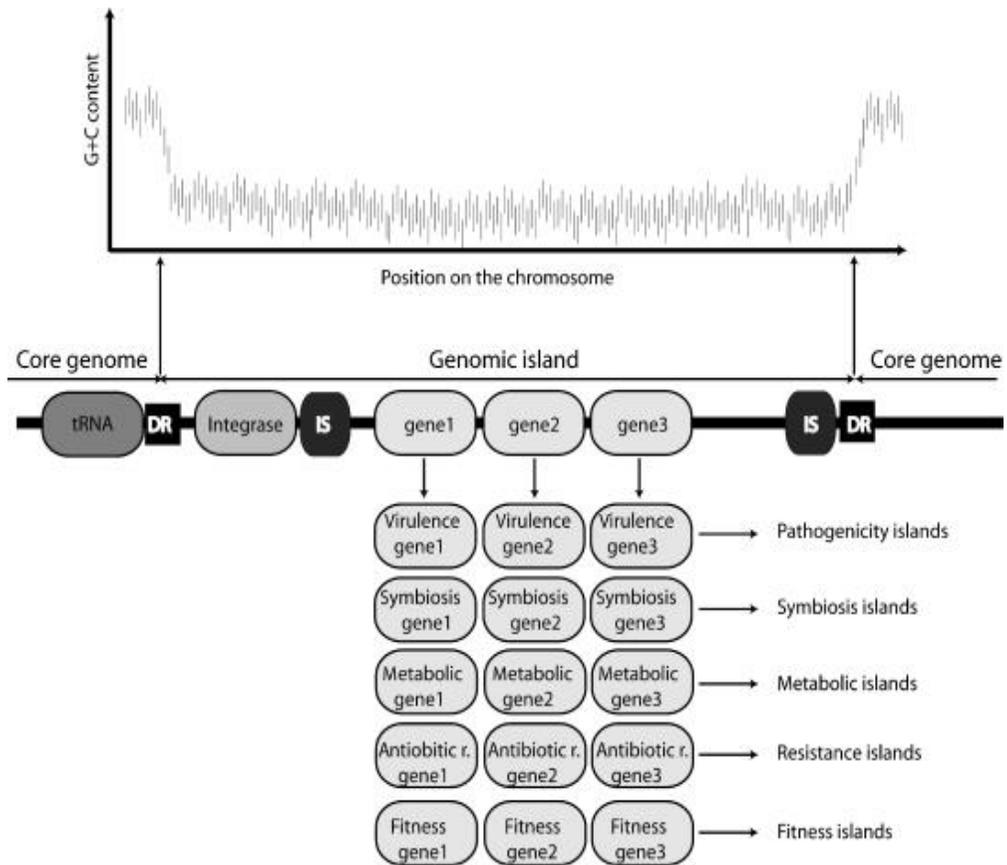
Uno de los mecanismos evolutivos que han permitido este tipo de ventajas adaptativas mediante transferencia horizontal, son las islas genómicas (de sus siglas en inglés GEIs), que se definen como segmentos discretos de ADN que difieren entre cepas de la misma especie y que contribuyen a la adaptación y diversificación de los microorganismos (Juhas *et al.*, 2008). Las GEIs abarcan una amplia familia que incluyen transposones conjugativos, algunos profagos, elementos móviles de ADN y elementos integradores y conjugativos, con una gran variedad de tamaños y abundancia en los genomas bacterianos (Dobrindt *et al.*, 2004). En el año 1990 emergió el concepto de islas de patogenicidad (de sus siglas en inglés PAIs), gracias al grupo de trabajo de Hacker (Hacker *et al.*, 1990), quienes enfocaron sus investigaciones en aislados uropatógenos de *Escherichia coli*, encontrando en regiones cromosómicas de cepas virulentas PAIs inestables.

La mayoría de islas genómicas conocidas comparten las siguientes características (Figura 2.1):

- Son segmentos relativamente grandes de ADN, con tamaños comprendidos entre los 10 y 200 kb. En los casos que tras secuenciación genómica comparativa se han encontrado regiones con tamaños menores

a 10 kb se les ha denominado islotes genómicos (Hacker and Kaper, 2000 ).

- Las GEIs suelen estar flanqueadas por repeticiones directas (DR) de entre 16 a 20 pb, perfectas o casi perfectas. Estas DR pueden actuar como secuencias de reconocimiento para la escisión enzimática de los genes diana (Schmidt and Hensel, 2004).
- Pueden reconocerse mediante estadísticas de nucleótidos ya que generalmente difieren en el contenido de GC, la frecuencia de tetranucleótidos o la desviación acumulativa de GC.
- A menudo tienen genes funcionales que codifican integrasas o factores relacionados con sistemas de conjugación de plásmidos o fagos involucrados en la transferencia de IEG. Así mismo, suelen tener elementos de inserción o transposones, que pueden estar implicados en la movilización de material genético (Buchrieser, Prentice and Carniel, 1998 ; Gal-Mor and Finlay, 2006).
- Con frecuencia portan genes que ofrecen una ventaja selectiva para las bacterias que las poseen. De acuerdo con su contenido genético, las GEIs se clasifican en islas de patogenicidad, islas de simbiosis, islas metabólicas, islas de resistencia o islas de fitness bacteriano (Dobrindt *et al.*, 2004 ; Schmidt and Hensel, 2004)



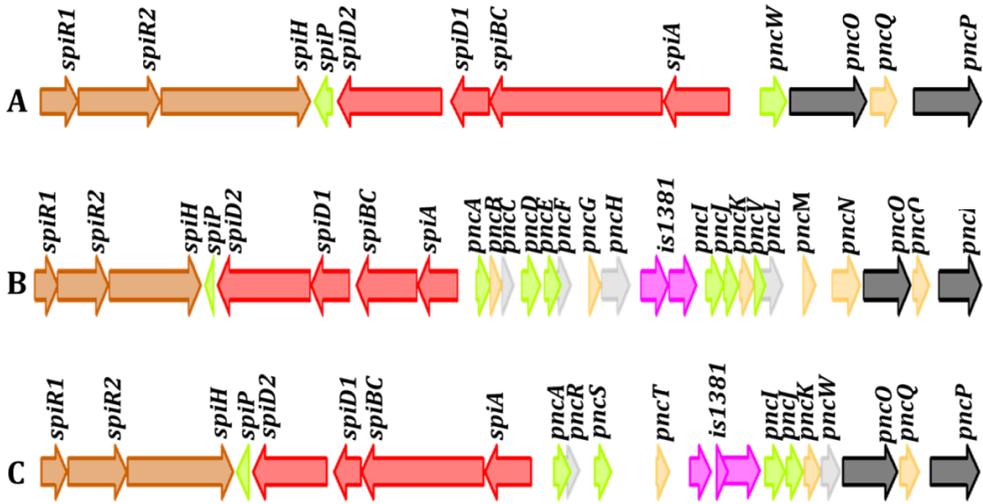
**Figura 2.1. Características generales de las GEIs.** De acuerdo con su contenido genético, las GEIs pueden describirse como islas de patogenicidad, de simbiosis, metabólicas, de fitness o de resistencia. Tomado de Juhás *et al.*, 2008.

La capacidad de codificación de las GEIs puede incluir rasgos tan diversos como las propiedades catabólicas. Un ejemplo de ello es el elemento *clc* de la cepa *Pseudomonas sp.* B13 que le permite la degradación de clorocatecol y 2-aminofenol y el transporte de compuestos aromáticos (Gaillard *et al.*, 2006). También pueden contribuir a la síntesis de sideróforos, biosíntesis de citocromo *c* y resistencia al mercurio como en la cepas de *Pseudomonas aeruginosa* C y SG17M, (Larbig *et al.*, 2002) e incluir genes para la simbiosis en cepas de *Mesorhizobium loti* R7A (Sullivan *et al.*, 2002). Los análisis bioinformáticos han demostrado que los GEI tienden a tener genes más "novedosos" (es decir,

aquellos que no tienen ortólogos en otras especies) que el resto del genoma (Hsiao *et al.*, 2005). Esto sugiere que los GEI se han seleccionado para funciones adaptativas y auxiliares, siendo difícil proporcionar una definición exacta al tener un amplio espectro de variedades en términos de organización genética y funcionalidad.

La presencia de islas bacteriocinogénicas ha sido anteriormente descrita en algunas especies de *Streptococcus* tales como el operon *Blp* o el *Spi* identificados en genomas de *S. pneumoniae* (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann and Hakenbeck, 2000; Lux T. *et al.*, 2007). En general, en el sistema se pueden diferenciar dos partes, una integrada por un péptido feromona que presenta un dominio de doble glicina y que está flanqueado por un transportador ABC, un sistema de transducción de señales y una proteína que contiene un dominio peptidasa C-39, implicadas en la escisión de péptidos líder de bacteriocinas que presentan el motivo doble G. Tras esta región aparece otra, donde se codifican varias bacteriocinas hipotéticas que presentan el motivo GG, proteínas vinculadas con la inmunidad y proteínas de membrana de la familia de las CAAX prenil endopeptidasa, que entre otras cosas participan en la escisión de péptidos líder de bacteriocinas con dominio GG. Además, se encuentran proteínas hipotéticas o putativas de membrana con función desconocida.

Hasta la fecha se han descrito varias islas en diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae* como la R6, 2306, 628 y TIGR-4 (Figura 2.2).

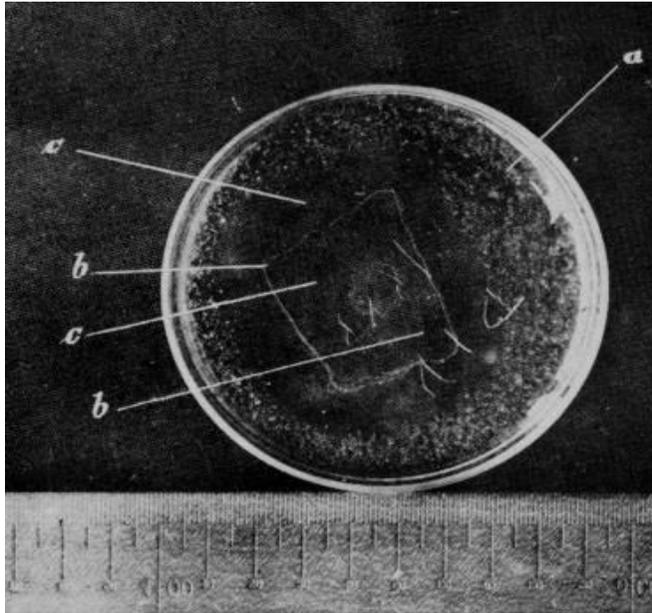


**Figura 2.2:** Islas bacteriocinogénicas identificadas en los genomas de:  
 A) *S. pneumoniae* R6, B) *S. pneumoniae* 628, TIGR-4, y C) *S. pneumoniae* 2306.

La producción de sustancias antagonicas bacterianas constituye un mecanismo de defensa ancestral efectivo, como las bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos biológicamente activos, procesados o no por enzimas de modificación postraduccional, y que son exportados al medio extracelular (Cotter, Hill and Ross, 2005). Las cepas que son capaces de producir estas bacteriocinas tienen una ventaja competitiva en su nicho ecológico, aun cuando se ha estimado que la mayoría de especies bacterianas tienen la capacidad de producir una o varias bacteriocinas (Tagg, 1992).

Los primeros investigadores que reportaron interacciones antagonistas entre bacterias fueron Pasteur y Joubert en 1877, tras observar que un aislado bacteriano era capaz de interferir en el crecimiento de *Bacillus anthracis*. La primera fotografía que registró un proceso de antagonismo bacteriano fue publicada en Kiel por Doehle en 1889 y mostraba cómo colonias de *Bacillus anthracis* crecidas en medio sólido eran inhibidas por un microorganismo llamado

*Micrococcus anthracotoxicus* que había sido sembrado en la superficie del agar en forma de cuadrado (Florey, 1946) Figura 2.3.



**Figura 2.3. Imagen original de la primera ilustración publicada refiriendo una acción antimicrobiana.** Placa de agar sembrada con *Bacillus anthracis* y *M. anthracotoxicus* (cuadrado de agar inoculado en la superficie de la placa). Se observa que alrededor del cuadrado no hubo crecimiento de *B. anthracis*, probablemente por la difusión de alguna sustancia inhibitoria producida por *Micrococcus* (Tomada de Doehle, 1889; citada en Florey, 1946)

De forma similar, en 1909 Schiøtz observó cómo cepas de *Staphylococcus* spp tenían una acción inhibitoria sobre especies de *Corynebacterium diphtheriae*. Gracias a este descubrimiento se comenzaron a utilizar aislados de *Staphylococcus* para el tratamiento frente a la difteria, aplicándolos en forma de aerosol.

Gratia en 1925 fue quien dilucidó los mecanismos de inhibición que ocurren en estos procesos de interacciones microbianas, estudiando las células de la cepa *Escherichia coli* V que producían en medio líquido una sustancia estable a las oscilaciones de temperatura (colinicina V) y que además tenía una actividad inhibitoria frente al crecimiento de otros microorganismos taxonómicamente similares, como *Escherichia coli*  $\phi$ . Originalmente, las bacteriocinas fueron

denominadas colicinas, puesto que en la mayoría de los estudios se observó su síntesis en células de *E. coli*. Posteriormente, verificando que la síntesis de estas moléculas era común entre otras bacterias, no solamente en bacterias coliformes, se eligió el nombre de bacteriocinas para designarlas (Jacob *et al.*, 1953).

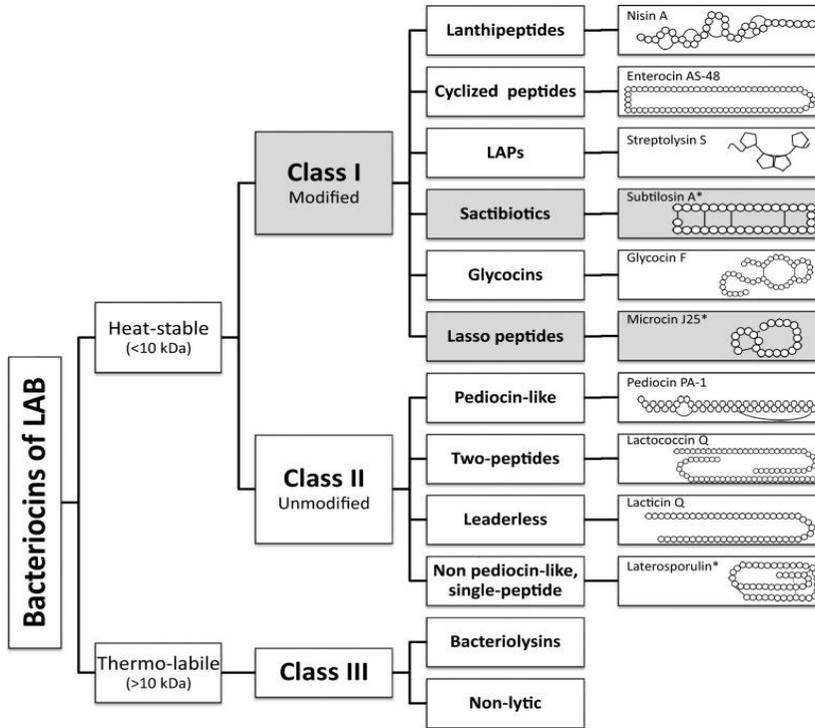
La primera clasificación de las bacteriocinas fue propuesta por (Klaenhammer, 1993) y desde entonces han surgido nuevas formas de clasificación en base a la creciente información disponible. El esquema más reciente fue sugerido por (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016), haciendo algunas modificaciones al esquema propuesto por (Cotter, Hill and Ross, 2005) que ha sido usado durante años con gran aceptación. Según el mecanismo de biosíntesis y la actividad biológica de las bacteriocinas, éstas pueden clasificarse en tres clases (Figura 2.4):

- **Clase I RiPPs: Péptidos con modificaciones postraduccionales (lantibióticos).** Esta clase incluye a todos los péptidos que sufren modificaciones enzimáticas durante la biosíntesis. Suelen tener tamaños menores a los 10 kDa y contienen un péptido líder que permite el reconocimiento de enzimas, además de aminoácidos poco frecuentes como la lantionina y la B-metil lantionina. En este grupo encontramos la nisina, un lantibiótico tipo I producido por *Lactococcus lactis*, una de las bacteriocinas más estudiadas producida por bacterias ácido lácticas (Gross and Morell, 1971). La clase I se subdivide en 6 subclases, Clase Ia: lantipéptidos (tipos I, II, III y IV); Clase Ib: *péptidos cíclicos* del tipo “*cabeza-cola*”; Clase Ic: sactibióticos; Clase Id: péptidos lineales azolados; Clase Ie: glicocinas y Clase If: péptidos Lasso.
- **Clase II. Bacteriocinas no modificadas.** Esta clase agrupa bacteriocinas que no contienen modificaciones inusuales. Por ello, no requieren enzimas para su maduración, más que una peptidasa líder y /

o un transportador. Suelen tener un tamaño menor a 10 kDa y a su vez se subdividen en 4 clases. Las Clase IIa son bacteriocinas similares a la pediocina, con amplio espectro bacteriano pero especialmente activas frente a cepas de *Listeria* (Kjos *et al.*, 2011). Las Clase IIb, bacteriocinas que constan de dos péptidos diferentes y la actividad completa suele requerir la presencia de ambos péptidos en cantidades aproximadamente iguales (Nissen-Meyer *et al.*, 2009). Las Clase IIc bacteriocinas que se sintetizan sin un péptido líder N-terminal, que generalmente funciona como secuencia de reconocimiento para la secreción y modificación y mantiene la bacteriocina inactiva dentro de la célula productora (Liu *et al.*, 2011; Masuda, Zendo and Sonomoto, 2012), y por último la Clase IIc, bacteriocinas de un solo péptido que no son pediocinas, siendo un grupo heterogéneo con diferentes estructuras, mecanismos de secreción y formas de acción, como la lactococina 972, lactococina A y la enterocina B (Franz *et al.*, 2007).

- **Clase III.** Son proteínas antimicrobianas no modificadas de gran peso molecular (más de 10 kDa), lábiles al calor, con mecanismo de acción bacteriolítico o no, y generalmente compuestas por diferentes dominios. Por ejemplo, la enterolisina A, que contiene un dominio de endopeptidasa N-terminal y un dominio de reconocimiento de sustrato C-terminal de manera similar a la zoocina A ( Nilsen, Nes and Holo, 2003; Lai, Tran and Simmonds, 2002).
  
- Se propuso la creación de la Clase IV (Maqueda *et al.*, 2008), que agrupa bacteriocinas carentes de residuos modificados y que tienen una estructura circular, donde la unión peptídica cabeza-cola del propéptido origina una molécula madura. Este tipo de naturaleza circular hace que

los péptidos sean estables en amplios rangos de pH y temperatura, y que además sean resistentes a las exoproteasas.



**Figura 2.4.** Esquema de clasificación propuesto para bacteriocinas, y sus estructuras. Las clases identificadas *in silico* se representan en gris. \* Bacteriocinas de bacterias no lácticas. Tomado de Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016

Por otro lado, es importante señalar que el desarrollo de resistencias adquiridas a bacteriocinas no se ha documentado, posiblemente debido a su mecanismo de acción rápida y a la formación de poros en la membrana diana de las bacterias, incluso a bajas concentraciones, aunque debido a la resistencia inherente de algunos organismos, no es descartable que dicha resistencia sea transmisible. De igual forma, ya que son fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas, los fragmentos de bacteriocinas no son viables durante mucho tiempo en el cuerpo humano o en el medio ambiente, lo que reduce considerablemente la oportunidad que tienen las cepas diana para interactuar con estos fragmentos degradados. Es probable que la mayor ventaja de las bacteriocinas frente a los

antibióticos convencionales radique en su naturaleza de metabolito primario, ya que tienen mecanismos biosintéticos relativamente simples a diferencia de los antibióticos convencionales, que son metabolitos secundarios. Esto hace que mediante bioingeniería las bacteriocinas sean susceptibles de aumentar su actividad o especificidad hacia los microorganismos diana.

En el caso de las bacterias ácido lácticas (LAB), el principal interés radica en su potencial como conservante natural de los alimentos, ya que son inherentemente tolerantes al alto estrés térmico, incoloras, inodoras e insípidas, y conocidas por su actividad en un amplio rango de pH (Cleveland *et al.*, 2001; Chen and Hoover, 2003). Las bacteriocinas producidas por las LAB presentan un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias de deterioro y patógenas contenidas en los alimentos. Por ello, su uso en la industria alimentaria prolonga la vida útil de los alimentos, reduce la transmisión de patógenos transmitidos por los alimentos a través de la cadena alimenticia, proporciona protección en condiciones de elevadas temperaturas, modera la aplicación de conservantes químicos y permite la aplicación de tratamientos térmicos sin comprometer la seguridad alimentaria (Ross, Morgan and Hill, 2002; Gálvez *et al.*, 2007). Estas características ayudan aún más a preservar de forma más saludable las vitaminas y los nutrientes de los alimentos, así como a conservar sus propiedades organolépticas.

Para aplicaciones alimentarias, las bacteriocinas de las LAB tienen una ventaja significativa sobre los antibióticos convencionales, ya que se consideran de grado alimenticio. Por ello, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) clasificó a las LAB y sus subproductos como “Generalmente Reconocidos como Seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés) como un ingrediente alimentario humano (U.S. Food and Drug Administration, 1988). Además, la mayoría de bacterias LAB poseen la

*Presunción Cualificada de Seguridad* (QPS, de sus siglas en inglés). Además, para aplicaciones clínicas, las bacteriocinas se han presentado como una alternativa a los antibióticos comúnmente utilizados debido a la alta especificidad de algunas de ellas contra patógenos clínicos, incluidas algunas cepas resistentes a múltiples antibióticos. En la Tabla 2.1 se resumen algunas de las diferencias entre bacteriocinas y antibióticos convencionales

**Tabla 2.1 Principales diferencias entre las bacteriocinas de bacterias LAB y los antibióticos convencionales.** (Tomado de Perez, Zendo and Sonomoto, 2014)

CARACTERÍSTICA	BACTERIOCINAS	ANTIBIOTICOS
<b>Aplicación</b>	Alimentación / Clínica	Clínica
<b>Síntesis</b>	Ribosomal	Metabolito secundario
<b>Espectros de bioactividad</b>	Mayormente estrecho	Mayormente amplio
<b>Intensidad de la bioactividad</b>	Activo nano-a-micro molar	Activo micro-a-mili molar
<b>Degradabilidad de enzimas proteolíticas</b>	Alto	Moderado a ninguno
<b>Estabilidad térmica</b>	Alta	Baja
<b>Rango de pH activo</b>	Amplio	Estrecho
<b>Color / sabor / olor</b>	No	Sí
<b>Posible mecanismo de la célula diana desarrollando resistencia</b>	Adaptación a través de cambios en la composición de la membrana celular.	Determinante genéticamente, transferible que inactiva el compuesto activo.
<b>Modo de acción</b>	Formación de poros, inhibición de la biosíntesis de la pared celular.	Membrana celular o dianas intercelulares.
<b>Toxicidad hacia las células eucariotas.</b>	No (relativamente)	Sí

Con el uso de técnicas y metodologías "ómicas", el campo de las bacteriocinas ha sido enriquecido sustancialmente en cuanto a base de datos y herramientas online se refiere. Actualmente se encuentran páginas web que no sólo compilan información acerca de bacteriocinas (van Heel *et al.*, 2013) sino que también permiten hacer caracterizaciones "*in silico*" (Hammami *et al.*, 2013) y detección de "clusters" de genes de bacteriocinas (Blin *et al.*, 2013; van Heel *et al.*, 2013).

Un ejemplo es la plataforma BAGEL3 (<http://bagel.molgenrug.nl/>) que se describe como una herramienta de minería genómica, rápida, versátil, y válida para bacteriocinas modificadas y no modificadas, además de para la predicción de Péptidos Ribosómicos Modificados no-bactericidas (RiPP). Las secuencias de ADN en formato fasta se analizan en paralelo a través de dos enfoques diferentes; uno es el contexto de la búsqueda basada en genes RiPP de bacteriocinas y el otro es una aproximación directa comenzando con una llamada de ORFs (Open Reading Frames, o posibles genes) en Glimmer. A continuación, los ORF se enfrentan contra tres bases de datos y los Blast hits son anotados utilizando la base de datos PFAM o Uniprot.

Por otro lado, durante años se han utilizado diversas técnicas para el aislamiento y purificación de bacteriocinas. Inicialmente debería comprobarse que el efecto inhibitorio no sea producido por un pH ácido del medio. Para ello, a partir de cultivos de las cepas productoras y tras separación de las células por centrifugación (Jimenez *et al.*, 1993), se debería neutralizar el pH del sobrenadante obtenido y probar el efecto inhibitorio tras la neutralización sobre cepas indicadoras. Para comenzar el aislamiento de un nuevo péptido antimicrobiano es importante tener en cuenta que muchas bacteriocinas no se producen en grandes cantidades, por ello como primer paso es muy importante concentrar el sobrenadante que contiene la sustancia antimicrobiana. Con este fin se han implementado varios protocolos, como la concentración con sulfato de amonio, la absorción-desorción, la evaporación rotatoria y la extracción con solventes orgánicos.

En la precipitación con sulfato de amonio, las sales son separadas mediante cromatografía de filtración por tamiz (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Stoffels *et al.*, 1992; Jack *et al.*, 1995; Coventry *et al.*, 1996; Ivanova *et al.*, 2000).

Por otra parte, el método de adsorción-desorción desarrollado por (Yang, Johnson and Ray, 1992) es utilizado cuando la bacteriocina se encuentra asociada a la superficie celular, basándose en la premisa que a pH bajo se permite la adsorción del compuesto antimicrobiano a la membrana celular bacteriana y tras centrifugación se obtiene el pellet celular, que tras ser resuspendido en una solución 100 mM de NaCl a pH 2 favorece la desorción y liberación del compuesto de interés de la membrana celular de la bacteria hacia el exterior.

En cuanto a la purificación de bacteriocinas se pueden implementar distintas estrategias, pero las técnicas más utilizadas son la extracción en fase sólida C18 (SPE) o la cromatografía de intercambio iónico (IEC). La selección de una u otra o su combinación dependerá del del péptido que se quiera purificar. La cromatografía de intercambio iónico se puede combinar con el uso de resinas de intercambio catiónico o aniónico, que son capaces de separar los péptidos por su carga eléctrica a un pH definido. Puesto que la mayoría de las bacteriocinas tienen una carga neta positiva y un pH cercano a la neutralidad, el uso de resinas de intercambio catiónico es apropiado para su purificación. Por último, la técnica de HPLC de fase reversa ha demostrado ser muy útil, ya que las bacteriocinas son generalmente resistentes a diferentes disolventes orgánicos utilizados como fases móviles y a las altas presiones empleadas a través del proceso cromatográfico.

En el presente capítulo se pretende, por una parte, determinar el efecto antimicrobiano de las cepas de *S. dentisani* sobre algunos patógenos orales, identificando si dicho efecto tiene una naturaleza peptídica o es a través de la producción de peróxido de hidrógeno; y por otro lado, describir, identificar y caracterizar los péptidos antimicrobianos producidos por *S. dentisani* 7746.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Inhibición de *Streptococcus dentisani* frente a patógenos orales

Para determinar la inhibición producida por *S. dentisani* frente a diferentes patógenos orales, se cultivaron las cepas 7746 y 7747 en placas de agar infusión cerebro corazón (ICC Condalab®), durante 48 horas en atmósfera de aerobiosis a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron colonias individuales de cada cepa y se inocularon en 50 ml de caldo infusión cerebro corazón (ICC), en aerobiosis a 37°C durante 48 horas, o hasta que los cultivos alcanzaran una densidad óptica cercana a 1.5, medida en espectrofotómetro a 610 nm (BioPhotometer, Eppendorf). Tras la incubación, los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos, se recolectaron los sobrenadantes en tubos Falcon® (VWR) estériles de 50 mL y los sedimentos fueron descartados.

Los sobrenadantes obtenidos fueron concentrados diez veces mediante evaporación rotativa en un dispositivo digital RV 10 (VWR) con la siguiente configuración: baño calefactor a 40°C, 70 rpm de rotación, 100 mbar de presión y 30 minutos de funcionamiento. Tras la evaporación, se obtuvieron 5 ml de sobrenadantes concentrados, que fueron filtrados usando filtros con tamaño de poro de 0,2 µm (Millipore), y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Por una parte, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se visualizó el efecto de los sobrenadantes concentrados frente a tres importantes patógenos orales: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Prevotella intermedia* NCTC 13070, y *Fusobacterium nucleatum* DSMZ 20482. Para ello, previamente se crecieron las

cepas en los medios y condiciones de cultivo óptimos: *S. mutans* en ICC, aerobiosis y 37°C y *P. intermedia* y *F. nucleatum* en medio TSB a 37°C en anaerobiosis. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento (con una densidad óptica igual o cercana a 0,6 medida a 610nm), se tomaron 160 µl de cada cultivo. Estos 160 µl se mezclaron con 40 µl del sobrenadante de *S. dentisani* concentrado y se incubaron durante 30, 60 y 90 minutos a 37°C. Tras el periodo de incubación, las suspensiones se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos, con el fin de sedimentar las células bacterianas y descartar el sobrenadante.

Las células fueron resuspendidas en 500 µl de medio Karnovsky (formaldehído 10% 20 ml, glutaraldehído 25% 10 ml, Cacodilato de Sodio 0.2 M 70 ml) refrigerándolas a 4°C durante 12 horas, hasta su procesamiento. Posteriormente, fueron fijadas nuevamente con tetraóxido de osmio al 1% en PBS, durante una hora y se realizaron series de deshidratación con etanol, haciendo lavados con etanol a concentraciones del 30%, 50%, 70% y 80%, con una duración de 10 minutos en cada lavado, y un lavado final de 15 minutos con etanol absoluto. Por último, se realizó una deshidratación en punto crítico y un metalizado con oro-paladio. Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido S-4800 (Hitachi).

Por otro lado, se determinó también la actividad inhibidora de los sobrenadantes controlando el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175 y *S. sobrinus* CECT 4034 mediante mediciones de densidad óptica. Se realizaron pre-inóculos de *S. mutans* y *S. sobrinus* sembrando una única colonia de cada cepa en 10 ml de medio ICC, incubando durante toda la noche en aerobiosis, a 37°C sin agitación.

La densidad óptica del pre-inóculo se midió a 610 nm en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) y se diluyó con medio ICC, hasta obtener una

densidad óptica final de 0.05. Se pipetearon 160  $\mu$ l de las suspensiones bacterianas de *S. mutans* y *S. sobrinus* y se mezclaron con 40  $\mu$ l de sobrenadantes concentrados de *S. dentisani* por triplicado (concentración final de sobrenadante 2X), en una microplaca de 96 pocillos (Nunc® Microwell™). Como controles se usaron 160  $\mu$ l de las suspensiones bacterianas, mezcladas con 40  $\mu$ l de medio ICC 10 veces concentrado. Se pipetearon 160  $\mu$ l de las suspensiones bacterianas de *S. mutans* y *S. sobrinus* y se mezclaron con 40  $\mu$ l de sobrenadantes concentrados de *S. dentisani* por triplicado. La microplaca se introdujo en un lector de absorbancia (Infinite 200 PRO, Tecan) y se incubó a 37°C durante 24 h. La densidad óptica a 610nm de cada pocillo se midió cada 30 minutos durante todo el periodo de incubación.

## 2.2 Inhibición comparada de fracciones del sobrenadante

Usando colonias bien diferenciadas de las cepas 7746 y 7747, se realizó un cultivo en tubos Falcon® (VWR) con 50 ml de caldo ICC (Condalab®) por duplicado, a 37°C en aerobiosis. Cuando se alcanzó la fase estacionaria, se centrifugaron los cultivos durante 30 minutos a 4°C y 3000 rpm. El sobrenadante obtenido, se filtró inicialmente con filtros de membrana estériles de 0,22 micras (Millipore™), pasando el sobrenadante filtrado por una serie de filtros para centrifuga Amicon® de pesos moleculares nominales (NMWL) de 3.000 y 10.000 Daltons, recuperando tres fracciones: la menor de 3 kDa, la fracción entre 3-10 kDa y >10kDa. Las rondas de centrifugación para los tubos Amicon®, fueron de 40 minutos a 2.500 rpm, a una temperatura de 4°C. Por último, la fracción menor a 3kDa se concentró en el evaporador rotativo digital RV 10 (IKA®). De igual forma se concentraron 50 ml de caldo ICC, para usarlo como control en los ensayos en placa multipocillo.

Obtenidas las fracciones de sobrenadante de >10kDa, 10-3kDa y <3kDa, se

realizaron ensayos de inhibición. Para ello, a partir de una placa de agar ICC (Condalab®) cultivada durante 24 horas con *Streptococcus mutans* ATCC25175, se realizó un inóculo en 3 ml de caldo ICC con una densidad óptica inicial de 0.05 y se mantuvo en fase exponencial mediante diluciones seriadas. Con este cultivo en crecimiento se preparó una dilución en medio ICC, a una densidad óptica final de 0.1 medida a 600nm.

En una placa de 96 pocillos (Nunclon®) se añadieron 40 µl de las distintas fracciones de los sobrenadantes a 160 µl de cultivo de *S. mutans* y *S. sobrinus*, ensayando cada sobrenadante por triplicado en el equipo Infinite® F200 PRO (Tecan). La temperatura de incubación fue de 37°C, con una agitación orbital durante 20 segundos a 37 rpm antes de cada medida, y periodos de lectura cada 30 minutos.

### 2.3 Pruebas de peroxidasa y proteinasas

Para la evaluar la producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en las cepas de *S. dentisani*, se cultivó cada una de las cepas en medio ICC sólido en aerobiosis a 37°C y tras 24 horas de incubación se añadieron 10-15 µl de peroxidasa (64 µg/ml), a un lado de cada colonia y 10-15 µl de tampón PBS al otro lado. Posteriormente, se adicionaron 5 µl de cultivo de las cepas indicadoras (*S. mutans* y/o *S. sobrinus*), tal y como describe en trabajos previos (Kreth J *et al.*, 2005; Zhu and Kreth, 2012). Como control positivo se utilizó la cepa de *Streptococcus sanguis*, que es productor de peróxido de hidrógeno y *Streptococcus mutans* fue usado como control negativo, ya que es no productor y es sensible a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para las pruebas de proteinasa K se cultivaron las dos cepas de *S. dentisani* en agar ICC a 37°C en atmósfera de aerobiosis. Tras 24 horas de incubación, se añadieron 10-15 µl de proteinasa K (70 µg/ml) y 10-15 µl de PBS a cada lado de

las colonias. Posteriormente se inocularon 5 µl de una cepa sensible (*S. mutans*) a derecha e izquierda, tal y como se describe en trabajos anteriores (Kreth *et al.*, 2005; Zhu and Kreth, 2012). Como control positivo se usó la cepa de *S. mutans*, que es productora de bacteriocinas, específicamente de mutacina (Kreth *et al.*, 2005), y como control negativo se utilizó *S. sanguis*. Se visualizaron las placas tras una incubación durante 24 horas a 37°C. Tras la incubación se visualizaron las placas para detectar posible halos de inhibición.

Por otra parte, se realizaron pruebas de difusión en agar usando como bacteria indicadora *Listeria monocytogenes*, que suele ser muy sensible a la acción de péptidos antimicrobianos. Esta cepa se cultivó en 10 ml de caldo ICC a 37°C, durante 24 horas en aerobiosis. Al término de la incubación, se tomaron alícuotas de sobrenadantes concentrados de *S. dentisani* 7746 y 7747 10X y se les sometió a un tratamiento con proteasa y tripsina (Sigma-Aldrich®) durante 2 horas. A la vez, se fundieron en un baño a 60 °C tubos que contenían 7 ml de agar ICC al 0,7% de agar (agar blando) y se mantuvieron en estado líquido hasta su utilización.

En la cabina de flujo laminar, se dispusieron entre 5 y 8 cilindros de acero inoxidable previamente esterilizados sobre placas Petri conteniendo el medio base (ICC). Se adicionaron 200 µl del inóculo de *L. monocytogenes* a los tubos que contenían los 7 ml de agar blando, se homogeneizó mediante mezcla ligera con vórtex y se vertió en forma de doble capa sobre la placa base con los discos de acero. Se eliminaron uno a uno todos los discos de acero con ayuda de pinzas estériles, una vez solidificada la doble capa. En cada pocillo final se depositaron 100 µl de los sobrenadantes concentrados 10X (cepas 7746 y 7747) sin tratar, tratados con proteasa y tratados con tripsina. Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 37°C, durante 24 horas. Al final del período de incubación, se

visualizaron las placas para detectar los posibles halos de inhibición. Se utilizó como control positivo una cepa de *Enterococcus faecalis* productora, denominada MRR 10-3 (patentada por el departamento de microbiología de la UGR, Martín-Platero *et al.*, 2006).

## 2.4 Descripción de la Isla Genómica de bacteriocinas en la cepa *S. dentisani* 7746

Para purificar el ADN genómico de la cepa de *Streptococcus dentisani* 7746, se usaron colonias bien diferenciadas de la cepa 7746 y se realizó un cultivo en caldo ICC a 37°C en aerobiosis. Cuando se alcanzó la fase estacionaria, se utilizó el kit para extracción de ADN MasterPure (Epicentre), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Inicialmente, se fragmentaron aproximadamente 5 µg de ADN genómico y se utilizó la estrategia de secuenciación "single-ends", usando el equipo de pirosecuenciación 454 GS FLX (Roche). Además, se realizó una secuenciación adicional con química Titanium, siguiendo el protocolo de "paired-ends".

Las lecturas de baja calidad fueron filtradas y eliminadas. El ensamblaje *de novo* del genoma se realizó con el paquete de software Newbler, diseñado específicamente para ensamblar datos de secuenciación generados con plataformas de pirosecuenciación 454 GS-series (454 LifeSciences). Después de la secuenciación y el ensamblaje obtuvimos un borrador del genoma con 1981087 nt. El contenido de DNA G+C se calculó en 40.8% molar, siendo muy similar a otros valores de contenido DNA G+C de especies que pertenecen al grupo mitis del género *Streptococcus* (Kawamura *et al.*, 1998). Se obtuvieron ocho "scaffolds", con tamaños de entre 2000 y 1100000 nt, que fueron depositados en el European Nucleotide Archive (ENA) del EMBL–EBI con

números de acceso CAUJ01000001–CAUJ01000008 and CAUK01000001–CAUK01000006 para las cepas 7746 y 7747 respectivamente.

El genoma fue anotado mediante el programa Glimmer (Gene Locator and Interpolated Markov Model ER) y BLAST frente a la base de datos de nucleótidos del NCBI, para posteriormente analizar los genes identificados que son relevantes para el desarrollo del probiótico, en concreto los que pudieran conferir resistencias a antibióticos y los que pudieran codificar genes de virulencia o toxinas, así como los que pudieran conferir una acción beneficiosa, como los de la ruta arginolítica para tamponar el pH extracelular. Además, también se analizó el genoma con los programas de búsqueda de bacteriocinas Bagel3 (<http://bagel.molgenrug.nl/>) y AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>). Tras el análisis, se anotó la región entera de forma manual, con los programas Snapgene y Clon Manager.

Para determinar el contenido de G+C en la posible isla de *S. dentisani* 7746, se utilizó el contig NZ\_CAUJ01000007.1 de la cepa 7746 que contiene unas 447000 pb y con el uso de la web [http://insilico.ehu.es/oligoweb/my\\_skews](http://insilico.ehu.es/oligoweb/my_skews) (Bikandi *et al.*, 2004) se determinó el porcentaje de G+C y el uso de tetranucleótidos a lo largo de ventanas en todo el contig.

## 2.5 Purificación y caracterización de los péptidos presentes en el sobrenadante de la cepa *S. dentisani* 7746

Para la obtención de grandes volúmenes de sobrenadante, se inoculó 1 litro de caldo ICC con 50 ml de un cultivo crecido de *S. dentisani* 7746 hasta fase exponencial (D.O=0.8), del cual se tomó una alícuota para sembrar en placa y confirmar la ausencia de contaminación.

El litro de caldo ICC inoculado se incubó el tiempo necesario a 37°C en atmósfera de aerobiosis hasta alcanzar la fase estacionaria. Tras la incubación, se centrifugó a 4°C y 6000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron recuperados en botellas de vidrio estériles. De este cultivo también se sembró una alícuota en agar ICC, para confirmar que la morfología correspondiera a *S. dentisani* y descartar posibles contaminaciones.

La cromatografía se realizó en una estancia en el laboratorio del Dr Manuel Martínez, en la Facultad de Biología de la Universidad de Granada. Para la misma, se pesaron 5 g de resina CM Sephadex C-25 (Amersham Biosciences) como matriz de intercambio catiónico y se dejaron hidratando durante toda la noche con agua destilada. A continuación se lavó con NaCl 2M y nuevamente con agua destilada hasta eliminar los restos NaCl, con el fin de equilibrar la matriz.

El CM Sephadex C-25 lavado se mezcló con el sobrenadante total de *S. dentisani* obtenido anteriormente, en un frasco de 2 litros, agitando a 100 rpm a temperatura ambiente, durante por lo menos 30 min. Tras la agitación, se dispuso todo el contenido del frasco (sobrenadante+CM Sephadex C-25) en una columna de vidrio con placa porosa, en cuyo extremo se añadió un tubo de goma que, con ayuda de una pinza de Hoffman, se abría o cerraba el paso del sobrenadante. Todo el sobrenadante pasado por la columna de vidrio se recuperó y se reservó un alícuota de 2 ml en microtubo estéril, para testar si existía actividad inhibitoria. A continuación, se añadieron progresivamente 300 ml de agua Milli-Q por las paredes de la columna de vidrio, intentando alterar mínimamente el fondo de la columna donde se encontraba la resina, se recogió todo el volumen de agua pasada y se reservó alícuota de 2 ml para testar actividad.

A continuación, para eluir se utilizaron 300 ml de NaCl 0.2 M, depositándolo poco a poco dentro de la columna de vidrio, con volúmenes progresivos

utilizando una pipeta de 10 mL y por las paredes de la columna, sin alterar la resina contenida en el fondo. El eluido fue recogido en tubos de 50ml y se tomó una alícuota para testar actividad.

Para el siguiente paso, fue necesario preparar dos soluciones de solventes. El solvente A, que contenía ácido trifluoroacético 0.1% en agua Milli-Q, y el Solvente B, una mezcla (2:1) de isopropanol y acetonitrilo con 0.1% de TFA. Posteriormente, se mezclaron en distintas proporciones (30%, 60% y 90% de solvente B en A).

Se pesaron 5 g de la resina preparativa C18 55-105 UM 125A (Waters) para la captura de péptidos hidrófobos y se depositaron en una jeringa de 20 mL, en cuyo extremo se añadió un tubo de goma que abría o cerraba el paso del eluido con ayuda de una pinza de Hoffman. Se lavó la resina con solvente B al 100% (20mL). Tras ello, se equilibró con solvente acuoso (Solvente A-50 mL). Se dispuso todo el eluido obtenido del paso de CM Sephadex C-25 o las fracciones activas obtenidas de forma progresiva y por las paredes de la jeringuilla. Se recolectó todo el eluido tras el paso por C18 y se tomó una alícuota de 2 ml en microtubo estéril, para testar actividad.

A continuación, se pasaron 100 ml de solvente A con volúmenes progresivos y por las paredes de la jeringa, sin alterar la resina, se recolectó el eluido y se sacó una alícuota para testar actividad. Posteriormente se pasaron 100 ml de cada una de las proporciones (30%, 60% y 90% de solvente B en A). Todas las proporciones se pasaron por la jeringa con volúmenes progresivos y por las paredes para no alterar la resina, recolectando los eluidos y tomando alícuotas para testar actividad. Por último se pasaron 100 ml de Solvente B al 100%. En la *Figura 25*. se observa una imagen del procesamiento en el laboratorio con las resinas C18 55-105 UM 125A y CM Sephadex C-25.



**Figura 2.5.** Purificación en el laboratorio de las moléculas inhibitorias de *S. dentisani* con el uso de resinas C18 55-105 UM 125A y CM Sephadex C-25.

Todas las alícuotas recuperadas durante todo el proceso fueron testadas en tests de inhibición por gotas. Para ello, se utilizó como cepa sensible indicadora *Listeria monocytogenes* CECT 4032, manteniéndola en fase exponencial tras varios pases en caldo ICC. Se fundió un tubo que contenía 6 mL de medio BHA blando en sobre-infusión y, tras atemperar el medio de cultivo, se añadieron 120  $\mu$ L del cultivo de *L. monocytogenes*, se homogenizó y se depositó en una placa de Petri con agar Mueller Hinton (Scharlab) tamponado con tampón fosfato sódico 0,1 M a pH 7. Sobre el medio solidificado, se dispusieron 10  $\mu$ L de cada una de las alícuotas a testar y se incubó a 37°C en atmósfera de aerobiosis durante 24 horas. Al término de la incubación, y tras identificar alguna posible alícuota con actividad inhibidora, el paso siguiente fue liofilizar la alícuota, resuspenderla en solvente A y repurificarla mediante cromatografía líquida en fase reversa de alta resolución (RP-HPLC), usando una columna Phenomenex -Jupiter 10u C18

300A (250 x 10 mm) con relleno tipo C-18. La muestra se aplicó a un flujo de 1 ml/min sobre la columna equilibrada previamente con solvente A, la elución se realizó durante 43 minutos, con una presión máxima de 400 bar y siguiendo un protocolo de gradientes entre Solventes A y B, que se resume en la Tabla 2.2

**Tabla 2.2.** Protocolo de gradientes entre Solventes A y B

Tiempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0:00	100	0
5:00	60.0	40.0
7:00	60.0	40.0
20:00	60.0	40.0
22:00	35.0	65.0
38:00	35.0	65.0
40:00	0	100.0
43:00	0	100.0

El efluente de la columna fue recogido en distintas fracciones, de acuerdo con los picos de absorbancia detectados a 230 nm. El análisis de la masa molecular de las bacteriocinas se realizó mediante espectrometría de masas por la Unidad de Proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC en Granada. Para ello, realizaron la digestión de las proteínas con el equipo DigestPRO MS (Intavis AG). El protocolo de digestión incluía una reducción con ditioneitol (DTT), derivatización con Iodoacetamida (IAA) y digestión con Tripsina durante 6 h a 37°C. Posteriormente se acidificaba la muestra con TFA 0,2%. Una parte de las muestras se pasaron por ZT u-C18 para su limpieza y desalado. Para el análisis por espectrometría de masas, las digestiones fueron cristalizadas en una placa AnchorChip con ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) como matriz, y fueron analizadas en un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF modelo UltrafleXtreme de Bruker, obteniéndose los correspondientes espectros de masas y de fragmentación. La identificación de las proteínas a partir de las masas peptídicas y su fragmentación se realizó en bases de datos UniProtKB/Swiss-Prot utilizando MASCOT (MatrixScience)

como motor de búsqueda.

Para la determinación de la huella peptídica cada una de las posibles bacteriocinas fue sometida a una digestión teórica con tripsina usando el servidor MS-Digest de Protein Prospector, considerándose la carbamidación de las Cys como una modificación constante y la oxidación de las Met como variable. Además se tuvo que determinar cuál era el posible péptido líder de cada una para quitarlo durante el procedimiento. La masa teórica de cada una de estas proteínas fue calculada usando la herramienta ProtParam del servidor ExPASy.

Por otro lado, cabe anotar en este apartado, que se probaron también otros medios de cultivo, que permitieran la obtención de las bacteriocinas sin interferencia de los componentes propios del medio ICC o productos del metabolismo bacteriano que interferían en la identificación precisa y exacta de cada una de las sustancias antimicrobianas producidas por *S. dentisani*. Los medios de cultivo probados se detallan a continuación en la Tabla 2.3, especificando su composición.

**Tabla 2.3.** Medios de cultivo probados para el crecimiento de *S. dentisani*

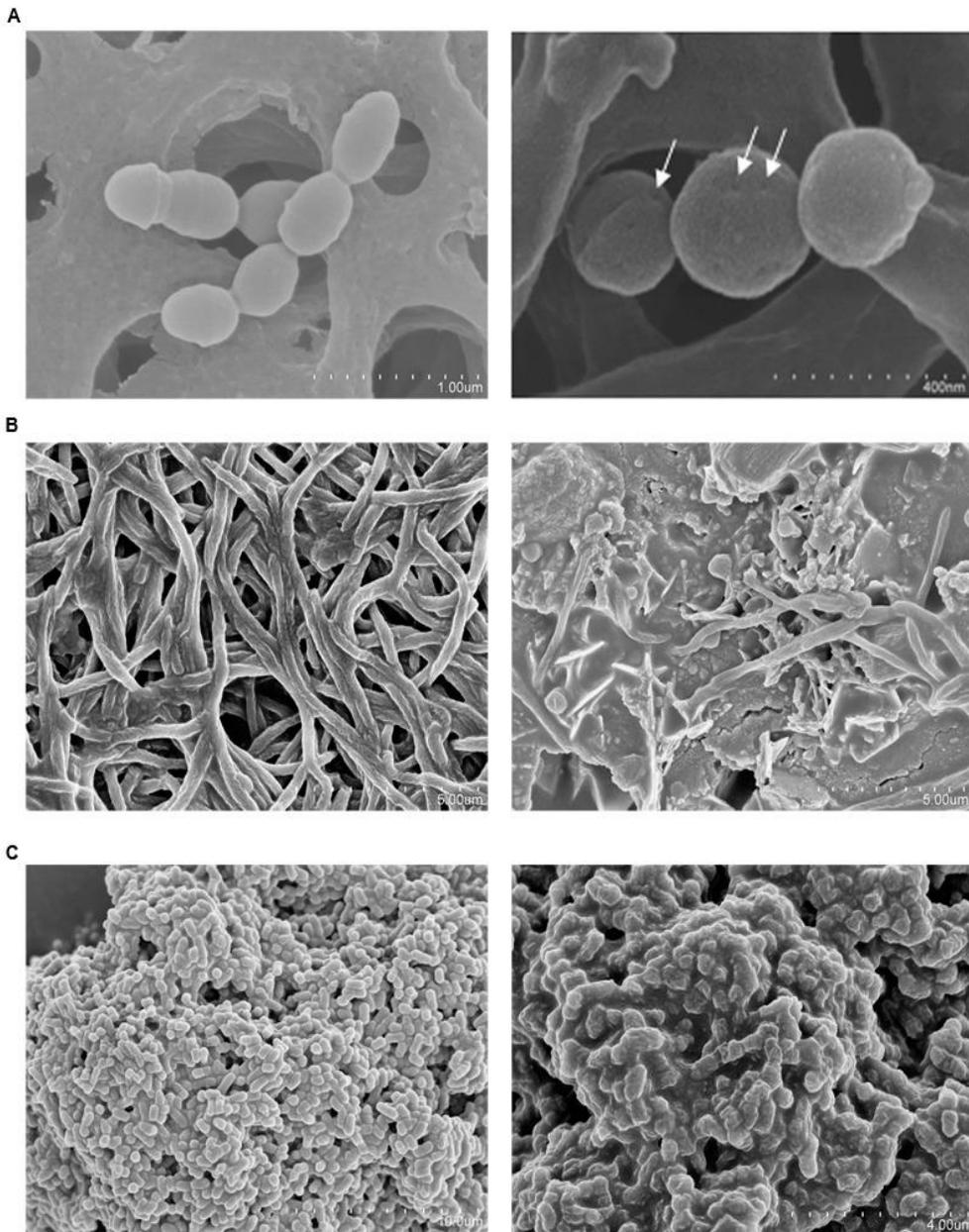
<b>MEDIO COMPLEJO</b> <b>(Gálvez <i>et al.</i>, 1986)</b>	Casaminoácidos (Difco)	2,00 g
	ICC	2,80 g
	Base nitrogenada para levaduras (Difco)	1,00 g
	Glucosa	10,00 g
	Fosfato monosódico	2,77 g
	Fosfato disódicodihidratado	6,56 g
	Sulfato magnésico heptahidratado	0,04 g
<b>Caldo M-17</b> <b>(Scharlau)</b>	Triptona	2,50 g
	Peptona de carne	2,50 g
	Peptona de soja	5,00 g
	Extracto de levadura	2,50 g
	Extracto de carne	5,00 g
	Glicerofosfato sódico	19,00 g
	Sulfato magnésico	0,25 g
	Ácido ascórbico	0,50 g
Lactosa	5,00 g	

### 3. RESULTADOS

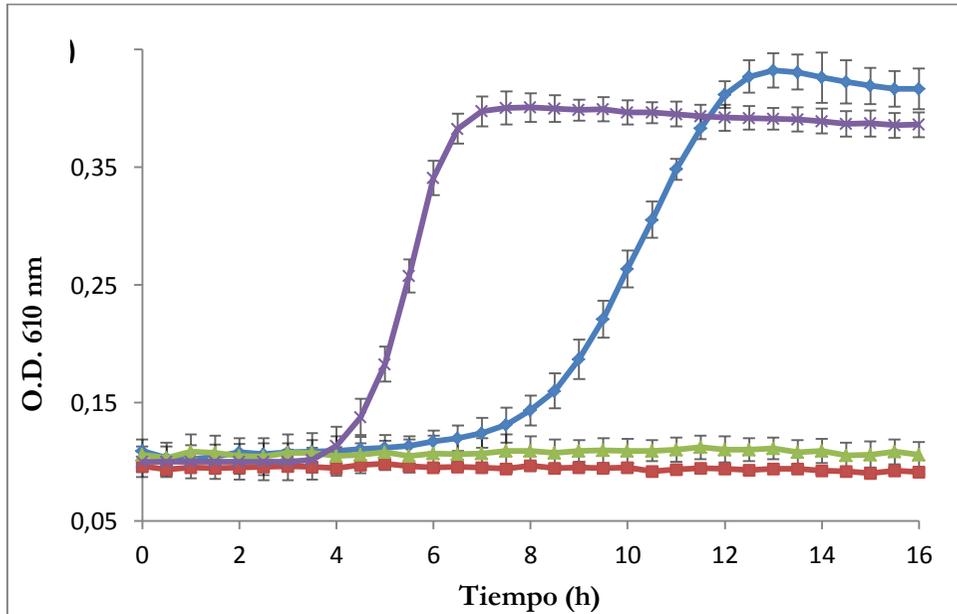
#### 3.1 Inhibición de *Streptococcus dentisani* frente a patógenos orales

Las visualizaciones con microscopía electrónica de barrido revelaron que, tras 30 minutos de incubación, las células de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Prevotella intermedia* NCTC 13070, y *Fusobacterium nucleatum* DSMZ 20482 se vieron claramente afectadas al estar en contacto con los sobrenadantes concentrados de las cepas de *S. dentisani* (Figura 2.6). Los daños se produjeron a nivel estructural, en las paredes celulares como se observa en *P. intermedia*, lisis celular (*F. nucleatum*) y poros en la superficie celular como es el caso de *S. mutans*.

Por otro lado, como se puede observar en la Figura 2.7, la adición del sobrenadante concentrado de *Streptococcus dentisani* 7746 produjo un marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *S. sobrinus* CECT 4034, en comparación con las curvas de crecimiento obtenidas cuando solamente se añade caldo ICC concentrado. Cabe anotar que el sobrenadante concentrado de las cepas de *S. dentisani* en otros experimentos realizados, inhibió el crecimiento de otras cepas de *S. mutans* (cepas OMZ175 y ATCC 700610) aunque los datos no se muestran en la presente tesis.



**Figura 2.6.** Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de tres patógenos orales, antes (izquierda) y después (derecha) de un tratamiento de 30 min con sobrenadantes concentrados de *Streptococcus dentisani* 7746. (A) *Streptococcus mutans* (involucrado en caries), las flechas indican poros sobre la pared celular (B) *Fusobacterium nucleatum* (involucrado en la formación de placa, en la halitosis y en el cáncer colorrectal). (C) *Prevotella intermedia* (involucrado en periodontitis y halitosis).

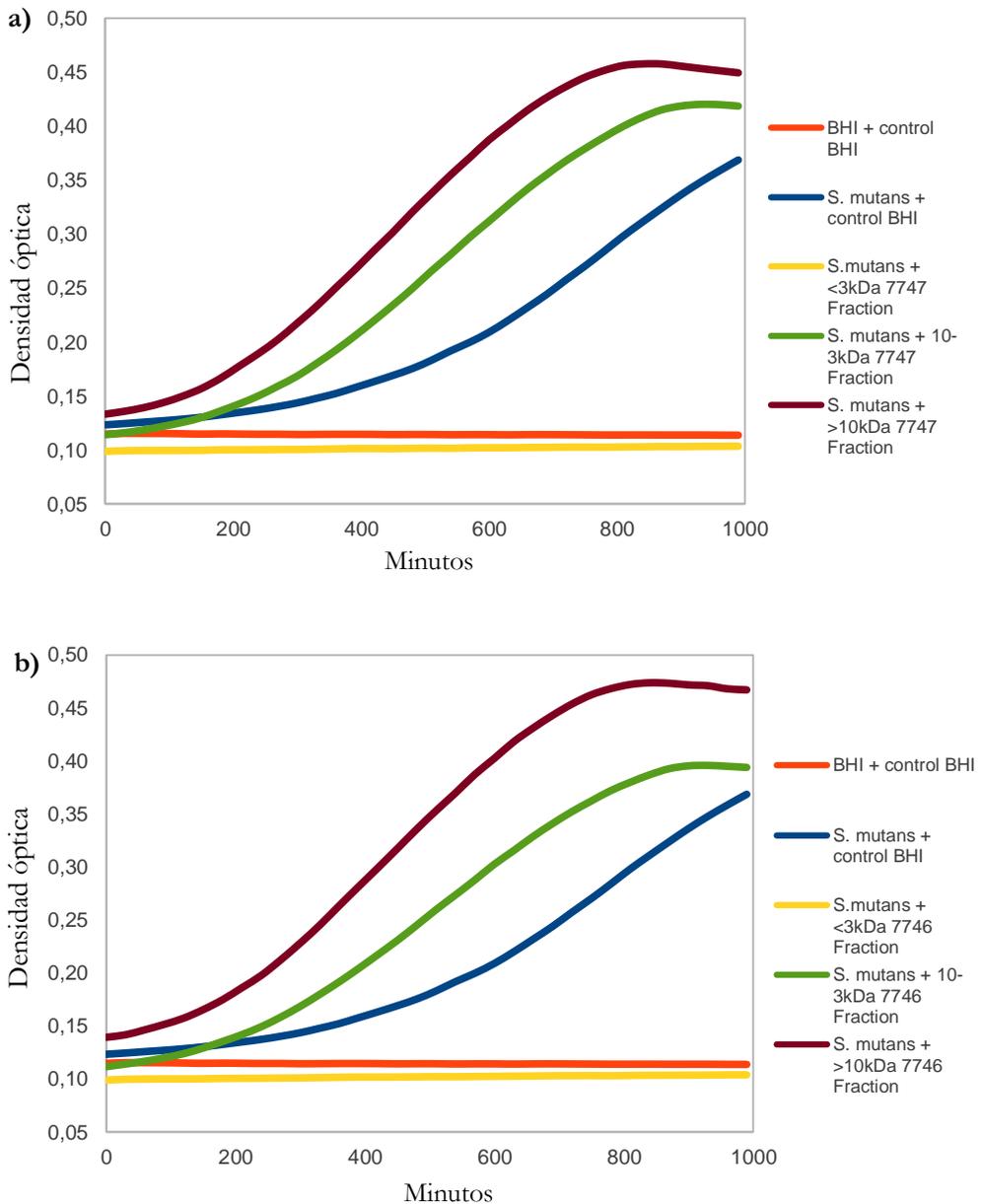


**Figura 2.7.** Curvas de crecimiento de las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sobrinus* CECT 4034 (líneas morada y azul respectivamente) en ausencia de sobrenadante concentrado de la cepa de *Streptococcus dentisani* 7746. La línea verde corresponde al cultivo de *S. mutans* en presencia del sobrenadante concentrado mientras que la roja corresponde a *S. sobrinus*. La concentración final del sobrenadante de *S. dentisani* fue 2X.

### 3.2 Inhibición comparada de fracciones del sobrenadante

La Figura 2.8 muestra los resultados obtenidos tras los ensayos de inhibición realizados con las distintas fracciones del sobrenadante. Como se observa en la Figura, las fracciones de 10-3 kDa y >10kDa producen un efecto beneficioso sobre el crecimiento de *S. mutans*, aumentando la densidad celular, expresada en una mayor lectura de la densidad óptica. Esto puede deberse a la mayor disponibilidad de nutrientes o productos del metabolismo de la cepas de *S. dentisani* que favorecen el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Así mismo, se puede observar que para las cepas *S.dentisani* 7746 y 7747, la fracción que demuestra una mayor capacidad de inhibición frente a *S. mutans* es la fracción menor a 3

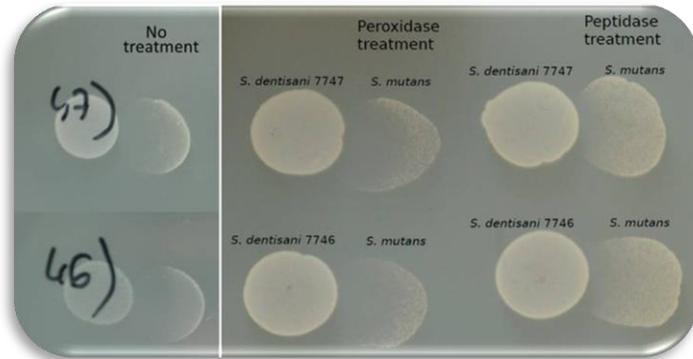
kDa, lo que sugiere que la capacidad de inhibición sea proporcionada por algún péptido de tamaño pequeño, como las bacteriocinas.



**Figura 2.8. Inhibición del crecimiento de *S.mutans*.** Comparación entre fracciones del sobrenadante de las cepas *S. dentisani* a) cepa 7746 y b) cepa 7747

### 3.3 Producción de peróxido y péptidos antimicrobianos

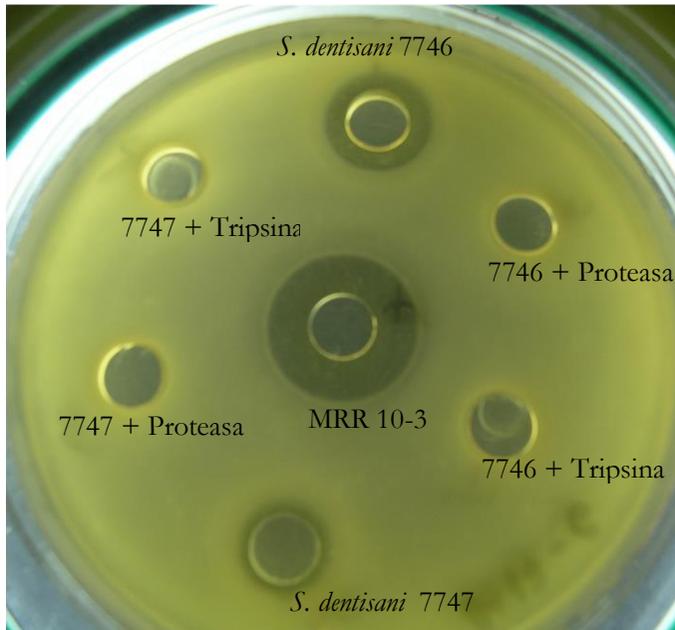
El tratamiento del sobrenadante de las cepas *S.dentisani* 7746 y 7747 con proteinasa K redujo considerablemente el grado de inhibición del crecimiento de *S. mutans*, mientras que el tratamiento con peroxidasa no afectó a la actividad inhibidora (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Inhibición de *S.mutans* por la cepa *S.dentisani* en presencia de peroxidasa y proteinasa. Los ensayos fueron realizados con las cepas 7746 y 7747 y los controles en el parte izquierda de la foto, muestran la inhibición sin tratamiento.

En los ensayos de difusión en agar se puede observar cómo tras los tratamientos con proteasa y tripsina las cepas de *S. dentisani* 7746 y 7747 pierden la actividad inhibidora en comparación con sus respectivos sobrenadantes sin tratar (Figura 2.10).

Tras evaluar los datos en conjunto, se concluye que la inhibición no se debe a la producción de peróxido de hidrógeno, y respalda la idea de que *S. dentisani* inhibe el crecimiento de las bacterias patógenas orales mediante la producción de inhibidores de naturaleza peptídica, tales como péptidos de tipo bacteriocina.



**Figura 2.10.** Ensayo de inhibición en agar o técnica de los pocillos, evidenciando la capacidad de inhibición de los sobrenadantes de *S. dentisani* (10X) sin tratamiento y con un tratamiento con tripsina y otro con proteasa. La cepa *E. faecalis* MRR 10-3 se usó como cepa productora control y como cepa indicadora se usó *L. monocytogenes* en sobrecapa.

### 3.4 Descripción de la Isla Genómica de bacteriocinas en la cepa *S. dentisani* 7746

En el genoma de la cepa 7746 de *Streptococcus dentisani* se ha localizado una región de unas 20kb, en la que se han identificado hasta 34 ORFs (Open Reading Frames) que guardan relación con la producción y regulación de diversas bacteriocinas. En la *Figura 2.11* se pueden observar los diferentes ORFs y su anotación mediante BLAST-P.

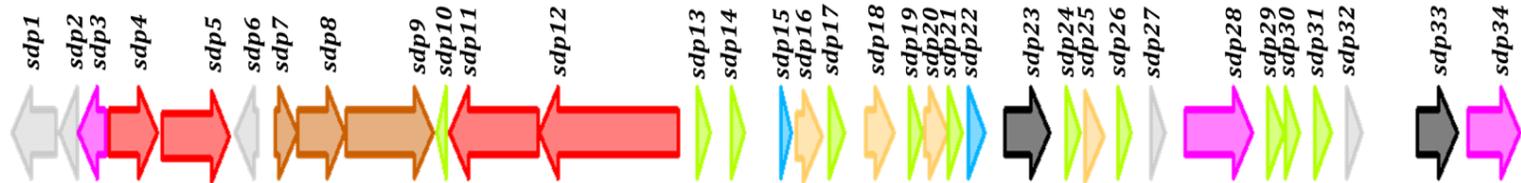
Como se mencionó en la introducción del presente capítulo, las regiones que integran las islas bacteriocinogénicas en ciertas especies de *Streptococcus* están bien diferenciadas. Tras compararlas con la isla encontrada en *Streptococcus dentisani* podemos observar que en la cepa de *S. dentisani* 7746 hay una región adicional

aguas arriba constituida por un transportador ABC y una proteína hipotética que aunque ha sido identificada en otros *Streptococcus*, no se conoce su función, pudiendo tratarse de otra posible bacteriocina. Tras búsqueda mediante BLAST en el genoma de la cepa 7747 y comprobación mediante PCR con primers localizados en la isla, se pudo comprobar que esta cepa no contiene dicha región genómica, y por tanto su inhibición se debe a otras bacteriocinas distintas a las codificadas en la isla de la cepa 7746.

En la isla de *S. dentisani* 7746 se pueden diferenciar tres regiones, una que comprende desde el gen *sdp1* hasta el gen *sdp6* (inclusive) y que contiene 3 proteínas hipotéticas, un transportador ABC permeasa, un transportador ABC proteína de unión al ATP y una proteína HIT con triada de histidina. Otra región donde se encontrarían diferentes elementos implicados en la regulación y que estaría conformada por *sdp7* hasta *sdp12*, y una tercera región desde *sdp13* hasta *sdp34*, en la que se han detectado varias posibles bacteriocinas, péptidos inmunitarios y peptidasas aminoterminales.

Las islas bacteriocinogénicas identificadas en *S. dentisani* no son iguales a las descritas en otras especies de *Streptococcus*, como *S. pneumoniae* (referidas en la introducción del presente capítulo). Se asemejan en la parte que codifica para los mecanismos de regulación, pero una de sus mayores diferencias es la región que presenta las bacteriocinas hipotéticas en *S. dentisani*. Además en *S. dentisani* hay un transportador ABC adicional y una proteína hipotética aguas arriba del inicio de los reguladores, que no han sido descritos en otras islas de especies cercanas.

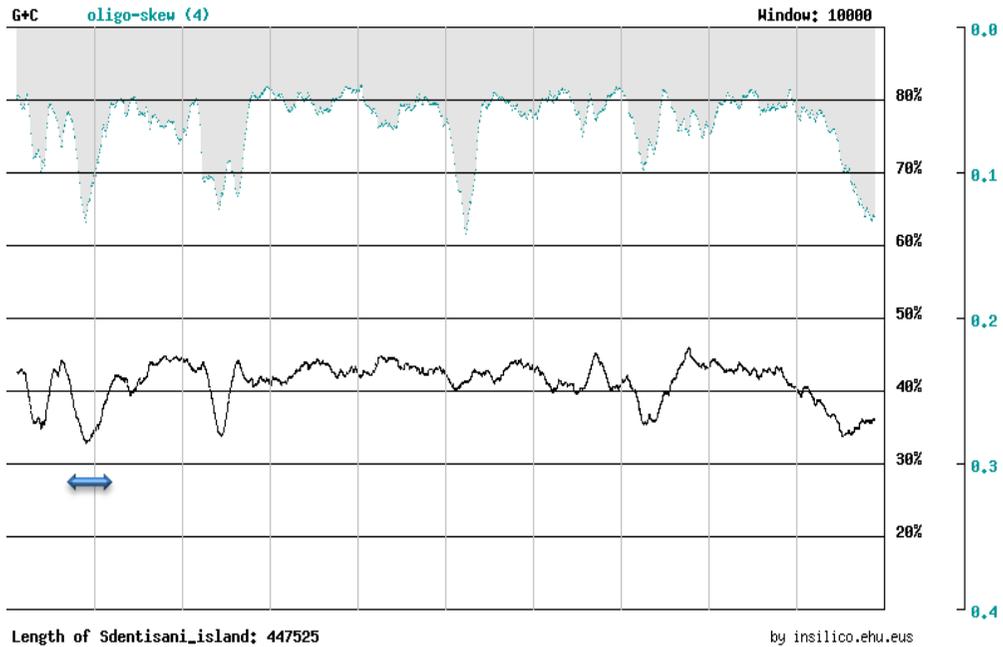
El alto número de posibles bacteriocinas y su concentración en una región concreta del genoma nos ha llevado a denominar esta región que contiene los inhibidores como Agrupación o Isla de Defensa Anti-Caries, o **ACDC**, por sus siglas en inglés (Anti-Caries Defense Cluster).



<p><b>Sdp1:</b> proteína hipotética</p> <p><b>Sdp2:</b> proteína hipotética</p> <p><b>Sdp3:</b> histidin triad protein (HIT)</p> <p><b>Sdp4:</b> transportador ABC proteína de unión al ATP</p> <p><b>Sdp5:</b> transportador ABC permeasa</p> <p><b>Sdp6:</b> proteína hipotética</p> <p><b>Sdp7:</b> regulador de la transcripción (LytR)</p> <p><b>Sdp8:</b> regulador de respuesta</p> <p><b>Sdp9:</b> histidina quinasa</p> <p><b>Sdp10:</b> posible bacteriocina (pheromona de acuerdo con otros autores)</p> <p><b>Sdp11:</b> transportador ABC</p>	<p><b>Sdp12:</b> transportador ABC permeasa+ proteína de unión al ATP+ peptidasa C-39</p> <p><b>Sdp13:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp14:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp15:</b> proteína hipotética de membrana</p> <p><b>Sdp16:</b> proteína inmunitaria (BlpLI)</p> <p><b>Sdp17:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp18:</b> proteína inmunitaria (BlpLI)</p> <p><b>Sdp19:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp20:</b> proteína inmunitaria (BlpX)</p> <p><b>Sdp21:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp22:</b> proteína hipotética de membrana</p>	<p><b>Sdp23:</b> CAAX aminoterminal proteasa</p> <p><b>Sdp24:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp25:</b> proteína inmunitaria</p> <p><b>Sdp26:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp27:</b> proteína hipotética</p> <p><b>Sdp28:</b> transposasa</p> <p><b>Sdp29:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp30:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp31:</b> posible bacteriocina</p> <p><b>Sdp32:</b> proteína hipotética</p> <p><b>Sdp33:</b> CAAX aminoterminal proteasa</p> <p><b>Sdp34:</b> aminoglucósido fosfo transferasa</p>
--	--	--

**Figura 2.11. ORFs identificados en la isla bacteriocinogénica Anti-Caries Defense Cluster (ACDC) de *S. dentisani* 7746:**  
 gris:proteínas hipotéticas, morado:proteínas (posiblemente) no vinculadas con la producción de bacteriocinas, rojo:transportadores ABC, marrón:proteínas implicadas en regulación y transcripción de señales, verde:posibles bacteriocinas, negro:CAAX peptidasas, amarillo:proteínas inmunitarias, azul:proteínas hipotéticas de membrana.

Tras la determinación del porcentaje de G+C en el contig NZ\_CAUJ01000007.1, se puede observar en la Figura 2.12 que alrededor de la posición 30-50 Kb (donde se localiza la ACDC) existe una composición particular, con una disminución del contenido de G+C y también en el uso de tetranucleótidos. Ello concuerda con la presencia de la agrupación de bacteriocinas en una isla con características genómicas diferenciales.

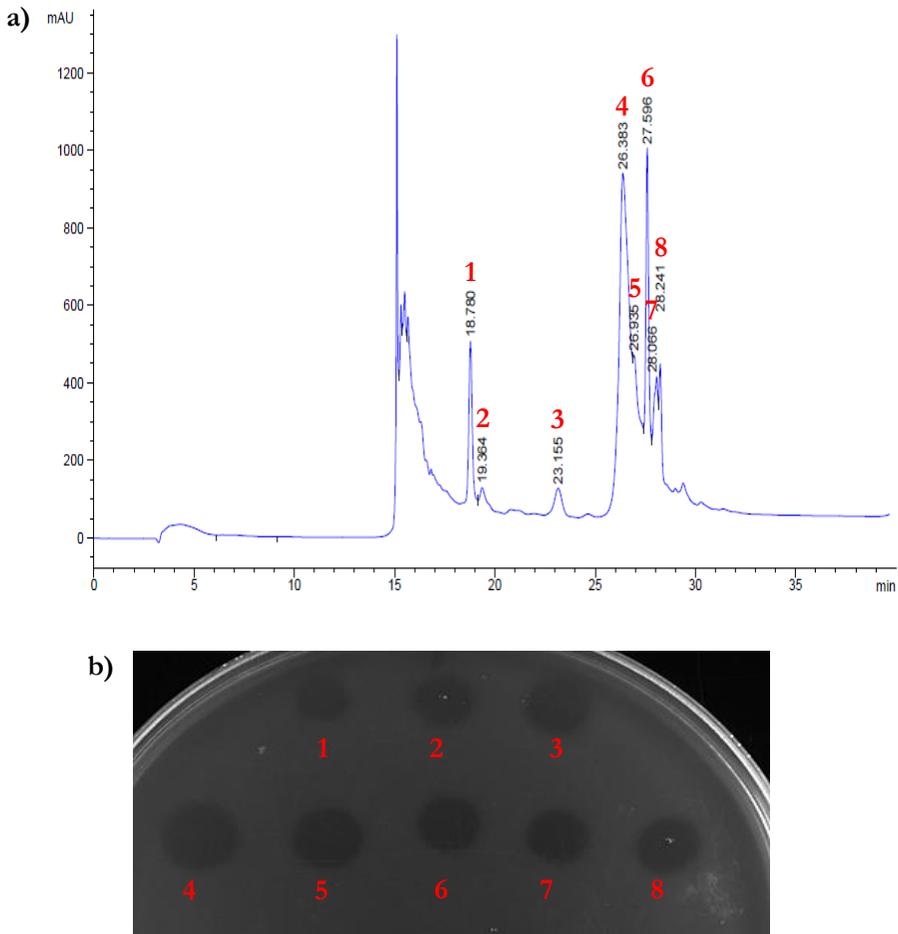


**Figura 2.12.** Determinación, en ventanas de 10 Kb, del porcentaje de G+C (línea negra) y frecuencia de tetranucleótidos (en gris) en el contig NZ\_CAUJ01000007.1 de *S. dentisani* 7746. Cada línea vertical corresponde a 44.75 kb de longitud. Se observa una disminución en el contenido en G+C y un sesgo en el uso de tetranucleótidos en la región de la isla de bacteriocinas ACDC (posiciones 30-50 Kb del contig).

### 3.5 Purificación y caracterización de los péptidos presentes en el sobrenadante de la cepa *S.dentisani* 7746

Tras someter el sobrenadante de *Streptococcus dentisani* a cromatografía de intercambio catiónico con CM Sephadex C-25, a la que se acopló una segunda de intercambio hidrofóbico con C-1855-105 UM 125A, se identificaron 8 picos

activos frente a *Listeria monocytogenes* (Figura 2.13). Además, el pico número 4 tenía cierta actividad frente a *Bacillus subtilis* y el número 8 frente a *Staphylococcus aureus*. Los resultados del análisis por espectrometría de masas usando el MALDI TOF/TOF para cada uno de los picos se puede observar en la Figura 2.14 (picos 1 al 8), donde se aprecia claramente que los picos no están totalmente puros, debido probablemente a la alta proporción de péptidos hidrófobos que contiene el medio ICC y que posiblemente eluyan al mismo tiempo que las posibles bacteriocinas.



**Figura.2.13.** a) Cromatografía por HPLC de las bacteriocinas producidas tras purificación por CM Sephadex C-25y concentración por C-18 55-105 UM 125A. b) Actividad de cada uno de los picos frente a *Listeria monocytogenes*.

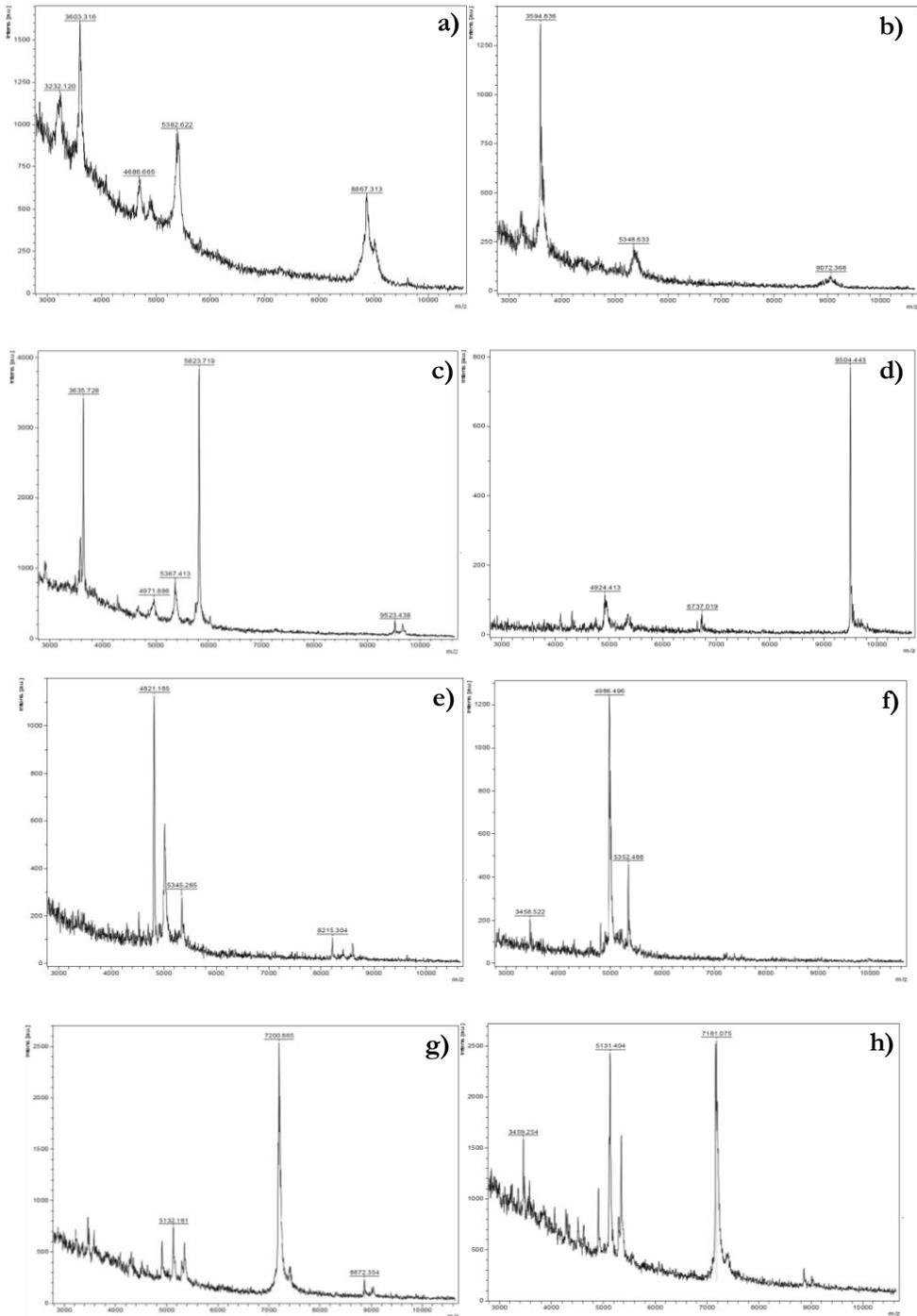
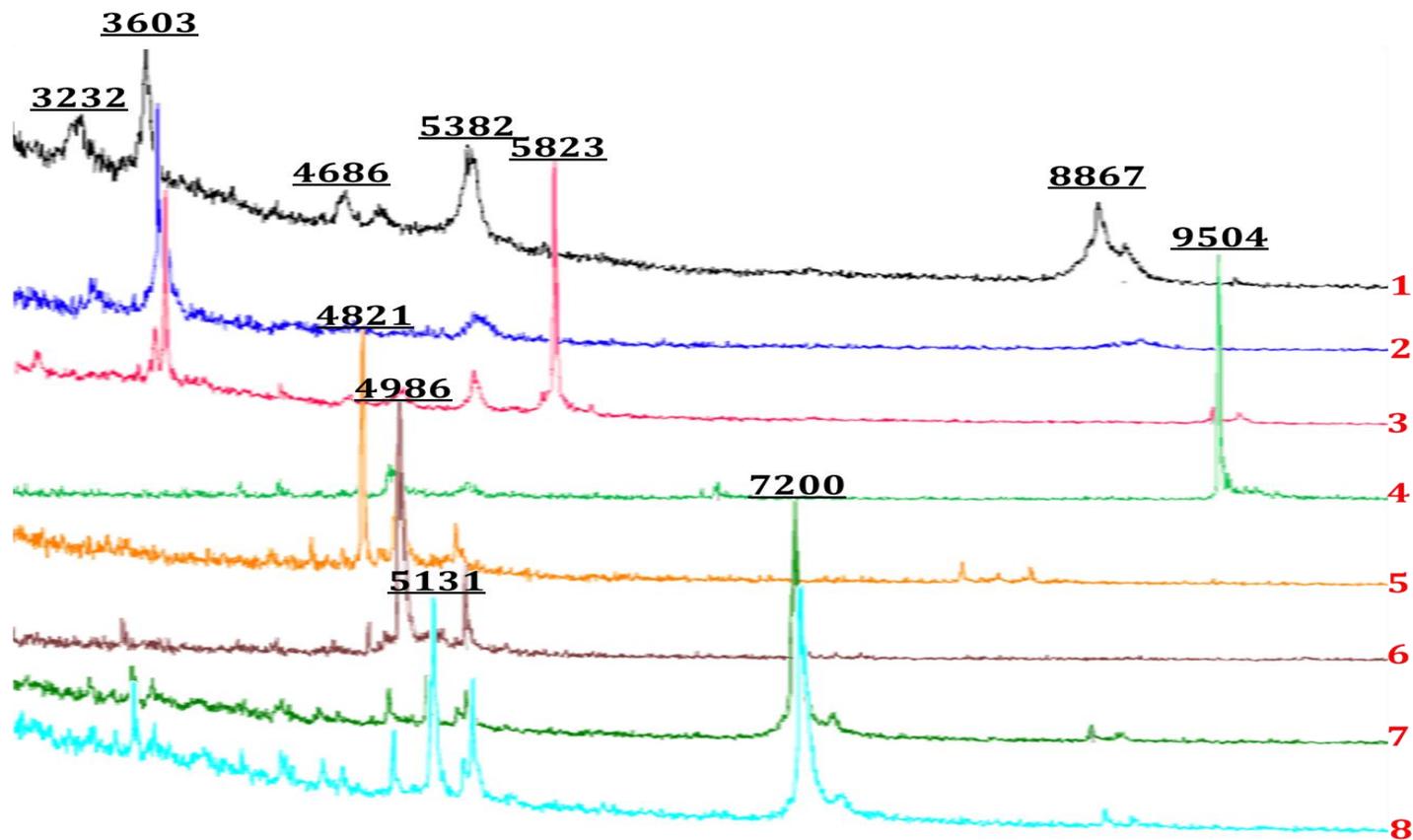


Figura 2.14. Análisis de masas por MALDI-TOFF de cada uno de los picos activos  
a) Pico1, b) Pico2, c) Pico 3, d) Pico 4, e) Pico5, f)Pico 6, g) Pico 7 y h)Pico 8

Tras superponer los 8 picos, se obtuvo la siguiente Figura (Figura 2.13), donde observamos que los picos 1 y 2 se podrían corresponder con la misma molécula activa, al igual que los picos 7 y 8.



En cuanto a la determinación de la huella peptídica, se analizaron 5 muestras, A, B, C, D y E a partir de nuevas purificaciones donde la muestra A se correspondía con los picos 1 y 2 del HPLC, B con el pico 3, C con el 4, D con 5 y 6, y E con 7 y 8. Y de acuerdo con los análisis bioinformáticos se han postulado las siguientes bacteriocinas con el siguiente posible patrón de corte para la tripsina:

**Clase I:**

>1150 (*orf1029*)

MNNLPNCPKCNSEYVYEDGSLLVCPECAEYEWNPAAEVAEVEEGVVAID  
ANGNKLADGDTVTLIKDLKVKGAPKDLKQGTRVKNIRIVEGDHNID  
CKIDGFGAMKLGSEFVKKI

> 1125 (*orf0580*)

MKRILIAPVRFYQRFISPAFPPSCRFEPTECSNYMIQAIEKHGFKGVLMGL  
ARILRCHPWSKTGKDLVDPDHFSKRNQEEK

**Clase II:**

En este caso todas presentaban el dominio doble glicina (GG) característico de las bacteriocinas de clase IIb y fue considerado péptido líder todos los aminoácidos aguas arriba de este dominio (marcado en negrita).

>sdp30 (*orf0528*)

**MNTYYNVDETMLSEIYGGNSGGA**AVVAALGCAAGGVKYGKFLGPW  
GAAIGGIGGALICGYLAYSATS

Para este ORF se identificaron hasta 5 posibles zonas de corte, realizándose el análisis de digestión para las 5 posibles bacteriocinas que podrían surgir. Las masas teóricas podrían ser de 4490.1 en el primer caso, 4174.8 en el segundo, 3162.7 en el tercero y de 1559.8 y 1332.5 en la 4 y 5 opción. Ninguna de las masas teóricas fue correspondida con masas experimentales tras el análisis.

>sdp29 (*orf0529*)

**MDTKMIEQFHEMDITMLSSIEGG**KNNWQTNVLEGGGAFFGGWG  
LGTAICAASGVGAPFMGACGYIGAKFGVALWAGVTGATGGF

Las masas teóricas calculadas para esta proteína fueron de 5824.6, 4426.1 y 4022.6 considerando cada GG. Ninguna fue detectada en MALDI-TOFF y tampoco se detectó por huella.

>sdp24 (*orf0534*)

**MNLKMMEQFEIMDTTEMLASKVGGKTIYYGNGLYCDNSKGCWVNW  
PEAINKILTNSIVNGFSGGNAGWNSGGPL**

La masa teórica para esta proteína es de 5351.9 existiendo coincidencia en la muestra B donde aparecía una masa de 5352.24 (que se corresponde además con el pico de mayor intensidad) que puede corresponderse con esta proteína.

>sdp17 (*orf0542*)

**MNTKMMEQFEIMDTDMLAKVEGGFGGWGDMIAGLLGGLAPSPIL  
DQLNGKWPIIHFSKPCGPYIGGGTPNSCNGI**

La masa teórica para esta proteína es de 5284.0, 5022.7 y 3951.5 respectivamente. Tanto en las muestras A como C (en especial en esta última) aparecen masas experimentales de 5283.77 y 5282.34 respectivamente que podrían corresponderse con esta proteína considerando hasta el primer GG como péptido líder.

>sdp26 (*orf0532*)

**MNTKMMEQFESMDTDMLACVEGGKKGDCETAISAGIGVGAVFA  
GPWGAVGLGTVTNMFFCATPVS**

Esta proteína no presentaría ningún sitio de corte para la tripsina y su masa esperada sería de 4235.9 Da, que no coincide con ninguna masa determinada.

>sdp31 (*orf0527*)

**MNTKMMEQFKIMDTTEMLASIEGGTDWGTVGKGAUVYAGIGVAMC  
TVGGLLTGGSAWAMTAGCAWAGAKLGGAFATAIADNIWP**

La masa teórica para esta proteína serían 5660.5 Da, no coincidiendo con ninguna de las obtenidas.

>sdp21 (*orf0537*)

**MEQSVNNFFILSDEKLT'TITAGDKQLADAFSLGAVGAVEGISLCMQT  
IPFPTPQIYLICAAGGAAASVLWPH**

La masa teórica es de 3727.4 Da, no habiéndose observado.

>sdp14 (*orf0545*)

**MKKIDYIALNEVELETISGGDDCFIGDIGCIGWGILKSIGGMKPGPY  
VPPVCIPKSSWNPAPPVPC**

La masa teórica para esta bacteriocina sería de 4896.8 Da en el primer caso y de 2775.3 en el segundo. No determinamos masas exactas con este valor, aunque si próximas, lo que podría indicar algún tipo de modificación, ya que mediante huella peptídica se ha confirmado ya por segunda vez la existencia de esta proteína y de la siguiente.

>sdp13 (*orf0546*)

**MNTKMMSQFSVIDNEMLDRIEGGIFGVDDAVFWTVGGYVVGRIVD  
TAIGDF<sup>T</sup>INQCRKNPHQWFCVRV**

Las masas teóricas para esta proteína serían de 4987.6 o de 3523.0 respectivamente, no observándose ninguna de ellas. Esta proteína al igual que la anterior ha sido confirmada su existencia anteriormente por huella peptídica.

>*orf0343*

**MTNFDKMEQNFVALTEEELTDVDGGSVTAVVVGGILLIGGIWGYF  
M**

La masa teórica para esta proteína sería de 2223.7Da, no habiendo sido observada de forma experimental.

>*orf0526*

**MF<sup>D</sup>YKIVDNQELSNISGGGLGGDVVVGALSGAFQAGQSCIAGGPQA  
YLICATGGAIVGGILAFGLRPPK**

La masa teórica para esta proteína sería de 4700.4, 4473.2, 2584.1 y 1508.8 no habiendo obtenido ninguna masa experimental con estos valores. Además no se digiere con tripsina.

>sdp19 (*orf0539*)

**MLACVEGGDKVGAGEVVQALGVCTIGGAALGSVIPVVGTLAGGILG  
AQFCTAAWGALRAS**

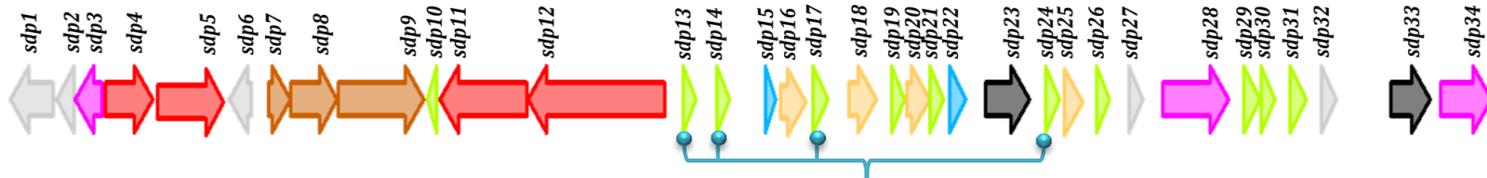
La masa teórica es de 4854.6 o de 3099.6 no observándose entre las experimentales. Al igual que en caso anterior no se digiere con tripsina.

>sdp10 (*orf0549*)

**MDKKQNLTSFQELT<sup>T</sup>TELNQITGGGWWENFLYSVNRYS<sup>H</sup>NLTQGL  
HQPIQL**

La masa teórica para esta proteína es de 3244.6 Da no obteniéndose ninguna experimental con este valor. Se trata de la feromona.

De acuerdo con los resultados de análisis de masas y huella peptídica, las posiciones de las bacteriocinas identificadas en el clúster se observan en la siguiente Figura (Figura 2.14):



<p>● <b>sdp24 (orf0534)</b>                      M.teórica: 5351.9                      M.experimental: 5352.24 (B)                      H.peptídica: A. 1473.70 Da (aa 16-27), 1795.85 Da (aa 1-15), 2236.14 +4?Ox. (aa 28-50)                      B. 1473.68 Da (aa 16-27), 1795.82 Da (aa 1-15), 2236.09 Da (aa 28-50), 1667.72 Da (aa 2-15), 3686.64 Da (aa 16-50)                      C. 1473.69 Da (aa 16-27), 1795.83 Da (aa 1-15), 2236.12 Da (aa 28-50)</p>
<p>● <b>sdp17 (orf0542)</b>                      M.teórica: 5284.0 - 5022.7 - 3951.5                      M.experimental: 5283.77 (A) 5282.34 (C)                      H.peptídica: C. 2729.29Da (aa 28 – 52), GG(2): 2729.29 (aa 25 – 49), 2424.18 (aa 1 – 24)</p>
<p>● <b>sdp14 (orf0545)</b>                      M.teórica: 4896.8 - 2775.3                      M.experimental: (B) 1938.90 (aa 1-17), 2026.08 (aa 18-36), 1215.55 +4 Mod. (aa 37-47).                      (C) 1938.91 (aa 1-17) , 2010.098 (aa 18-36), 2026.093 (aa 18-36)Ox, 1223.58 +12 (aa 37-47)                      (D) 1211.55 (aa 37-47), 2010.10 (aa 18-36), 1938.92 (aa 1-17) y 2026.10 (aa 18-36).                      H.peptídica: Confirmadas</p>
<p>● <b>sdp13(orf0546)</b>                      M.teórica: 4987.6 - 3523.0                      M.experimental: (C) 1371.67 Da (aa 34-43), 1609.77 Da (aa 20-33)                      (D) 1342.65 Da (aa 35-44), 1371.67 Da (aa 34-43), 1609.779 Da (aa 20-33), 1737.87 Da (aa 20-34), 2057.075 Da (aa 1-19)                      H.peptídica: Confirmadas</p>

## 4. DISCUSIÓN

Las enfermedades orales, como la caries dental, por su propia naturaleza de tipo polimicrobiano y por su compleja etiología, hace que las estrategias de inmunización tanto pasivas como activas sean ineficaces (Fejerskov, 2004 ; Simón-Soro and Mira, 2015). Se genera así la necesidad de buscar nuevas estrategias terapéuticas, como son la búsqueda de nuevas especies bacterianas con potencial probiótico que puedan funcionar como tratamiento o prevención de enfermedades bucodentales.

En los últimos años esta búsqueda se ha centrado en la identificación de bacterias propias del nicho, que puedan producir sustancias antimicrobianas frente a microorganismos cariogénicos, sin afectar la estabilidad de la composición de las comunidades orales. Pero tan importante como la identificación de potenciales bacterias productoras es la determinación y caracterización de los mecanismos mediante los cuales estas bacterias producen la inhibición del crecimiento de cepas patógenas de la cavidad oral.

Por ello, los resultados presentados en el presente capítulo fueron de suma importancia para el desarrollo del probiótico, ya que nos permitieron vislumbrar los mecanismos mediante los cuales la cepa de *Streptococcus dentisani* inhibe a algunos patógenos orales. Se observó por una parte, que *S.dentisani* presenta un amplio espectro de acción, ya que no solamente inhibe a patógenos orales importantes como *S. mutans*, *S. sobrinus* o *Prevotella intermedia*, sino que también actúa frente a microorganismos como *Fusobacterium nucleatum*. Este último dato es relevante, ya que es inusual que los probióticos orales comercializados o patentados actualmente actúen frente a esta especie, lo que representaría una ventaja para *S. dentisani* ya que *F. nucleatum* es responsable de un gran número de

patrones de coagregación con muchas especies orales y además se considera la principal bacteria "puente" entre los primeros colonizadores y los colonizadores tardíos de la placa dental (Kolenbrander *et al.*, 2002). Por ello, la inhibición de *F. nucleatum* impediría la adhesión por parte de patógenos orales y podría también contribuir al tratamiento de la halitosis, al estar asociado a la producción de compuestos volátiles de azufre (Krespiet, Shrimme and Kacker, 2006). La capacidad de inhibición del sobrenadante de *S. dentisani* sobre muchas especies bacterianas es congruente con la identificación de al menos 6 bacteriocinas, de forma que cada una de ellas pueda tener un espectro de acción distinta y que la combinación de las mismas pueda tener un efecto sinérgico.

Por otro lado, los resultados obtenidos nos permitieron sugerir que las moléculas inhibidoras producidas por *S. dentisani* son de naturaleza peptídica, ya que el efecto inhibidor se redujo significativamente mediante el tratamiento con proteinasa K pero no se vio afectado por la peroxidasa, lo que nos indica que la inhibición no se debió a la producción de peróxido de hidrógeno, un mecanismo común en otras especies de *Streptococcus* orales (Zhu and Kreth, 2012). Así mismo, el pequeño tamaño de las moléculas responsables de la inhibición (<3KDa) y la aparición de poros en la membrana de los patógenos orales testados, sugerían fuertemente que la inhibición fuese causada por sustancias antimicrobianas de tipo bacteriocinas.

La predicción de bacteriocinas, gracias a la comparación de los genomas de *S. dentisani* y las bases de datos ya mencionadas, nos permitió identificar una "isla de bacteriocinas" en la cepa 7746, en la que se han predicho 11 bacteriocinas diferentes. Este resultado se correlaciona con el amplio espectro de acción observado. A su vez, estos resultados nos planteaban otro desafío, la purificación y caracterización de todas las bacteriocinas o sustancias inhibitorias producidas por *S. dentisani* 7746. Para ello, se siguieron las estrategias comúnmente utilizadas en el aislamiento y caracterización de moléculas

inhibitorias en otras especies bacterianas. En nuestro caso, las metodologías basadas en el uso de las resinas de fase reversa (RP), de intercambio iónico y de captura de péptidos hidrófobos nos permitió detectar 8 picos, donde dos de ellos (1 y 2) (7 y 8) se podrían corresponder con la misma molécula activa. Por ello, se detectaron inicialmente 6 moléculas inhibitorias en total siguiendo la metodología descrita, de las cuales 4 fueron confirmadas por los datos de huella peptídica, estando todas localizadas en la isla ACDC.

Desafortunadamente, y aunque se probaron algunas modificaciones en los protocolos y medios de cultivo, ninguno permitió obtener mejores resultados, y trabajos futuros deberán determinar la localización y caracterización de todos los péptidos antibacterianos de *S. dentisani*, los cuales además varían entre cepas (la cepa 7747, por ejemplo, no contiene la isla ACDC y sin embargo tiene fuertes propiedades inhibitorias frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*). Uno de los factores "problema" puede ser el medio de cultivo como tal, ya que suelen tener péptidos hidrófobos que pueden eluir a la par que la molécula inhibitoria, lo que dificulta su aislamiento y posterior identificación. Por ello, trabajo futuro debe ir encaminado a caracterizar el resto de las bacteriocinas de la isla, por ejemplo mediante el uso de medios de cultivo más simples que permitan la inducción de los péptidos y el crecimiento de la bacteria sin interferir en el análisis posterior. Otra alternativa sería la clonación de los genes codificantes de los posibles péptidos en un vector para poder estudiar su actividad. Además, la identificación de las funciones de cada uno de los genes en la isla y su regulación puede permitir la caracterización de los péptidos y su expresión, a fin de la posible explotación de la misma. Desde el punto de vista aplicado, la caracterización de los péptidos y su producción abriría una vía alternativa a la aplicación del probiótico, como sería la elaboración de "cocktails" de péptidos dirigidos a distintas patologías (caries, periodontitis o halitosis), que podrían ser añadidos a productos de higiene dental.



## CAPÍTULO 3

### CAPACIDAD TAMPÓN DE *S. dentisani*

---



## 1. INTRODUCCIÓN

La microbiota oral debe enfrentar ciclos continuos de acidificación/alcalinización con valores de pH mínimos de 4 y con máximos de alrededor de 7 o mayores (Curran, Lieou and Marquis, 1995). Conforme el pH de la placa se acidifica, los protones se difunden a través de las membranas bacterianas y acidifican el interior de las células, afectando la actividad de las enzimas glucolíticas y comprometiendo la capacidad de producción de ATP, causando además un daño estructural a biomoléculas como el ADN y las proteínas (Quivey *et al.*, 2001).

Dentro de los mecanismos que permiten la adaptación y supervivencia de los microorganismos orales a estos cambios de pH, se incluyen el uso de F-ATPasas que bombean protones fuera de las células (Kuhnert *et al.*, 2004), cambios en la estructura de la membrana celular (Quivey *et al.*, 2000), la inducción de enzimas reparadoras de ADN y proteínas chaperonas (Jayaraman, Penders and Burne, 1997; Hahn, Faustoferri and Quivey, 1999; Hanna *et al.*, 2001), la producción de amoníaco por arginólisis y la degradación de la urea en amoníaco como se mencionó en la introducción de la presente tesis.

La arginina se encuentra libre en saliva en concentraciones micromolares, pero es abundante en péptidos y proteínas salivales (Van Wuyckhuysse *et al.*, 1995) y se cataboliza principalmente por el sistema de arginina deiminasa (ADS) de las bacterias orales en ornitina, amoníaco y CO<sub>2</sub>, con la generación concomitante de ATP (Liu *et al.*, 2012). Por tanto, el metabolismo de la arginina en nichos

orales ofrece la oportunidad para el desarrollo de nuevos enfoques anti-caries que puedan ser beneficiosos, por un lado a corto plazo al poder afrontar los desafíos del ambiente ácido y por otro lado a largo plazo, favoreciendo la presencia de bacterias deseables poco acidogénicas en la placa dental (Huang *et al.*, 2016). Para lograr este objetivo, es importante caracterizar los microorganismos que contribuyen a la arginólisis en la cavidad oral, y en investigaciones recientes se han identificado y aislado una larga lista de especies orales con capacidad arginolítica (Huang *et al.*, 2015).

Al analizar el genoma de *S. dentisani* 7746 y 7747 en el capítulo 1, detectamos la presencia de la ruta arginolítica completa en ambas cepas, lo cual abría la posibilidad de que la bacteria tuviera también un efecto tamponador del pH, lo cual sería una segunda característica potencialmente beneficiosa para promover la salud oral. En este capítulo quisimos abordar dos enfoques diferentes. Por un lado, en una aproximación abierta, analizamos el transcriptoma de las cepas *S.dentisani* 7746, *S.dentisani* 7747, *S.mutans* y cultivos mixtos, con el fin de identificar qué genes se expresaban diferencialmente entre las cepas y las mezclas con *S.mutans*. Mediante secuenciación masiva Illumina del transcriptoma, se pretendía identificar genes importantes para el posible efecto probiótico de la cepa y confirmar su funcionalidad, como los genes involucrados en el metabolismo de la arginina.

Por otro lado, y en una aproximación dirigida, estudiamos la respuesta de *S. dentisani* frente a la acidificación ambiental y su capacidad de amortiguación en diferentes fases de crecimiento y en diferentes condiciones, así como su comportamiento al crecer en un cultivo mixto con la especie cariogénica *S. mutans*. Específicamente, mediante PCR cuantitativa, nos centramos en los cambios de expresión de genes pertenecientes a la ruta arginolítica, con el objetivo de identificar bajo qué condiciones se activan dicha ruta.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Ensayos de transcriptómica global

#### 2.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Para la realización de estos experimentos realizamos, por una parte, cultivos puros de las cepas *S. mutans* CECT 479 y *S. dentisani* CECT 7746 y CECT 7747, y por otra cultivos mixtos de las mencionadas cepas en proporciones iguales (*S.mutans:S.dentisani* cepa 7746 o 7747).

Los preinóculos se obtuvieron tomando una única colonia de cada una de las cepas previamente crecidas en placas de agar ICC para inocular 10 ml de caldo infusión cerebro corazón (ICC). Se incubaron a 37°C en aerobiosis hasta alcanzar una densidad óptica medida a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de entre 0.9-1. Los cultivos se realizaron por duplicado en matraces que contenían 300ml de medio de cultivo, y se inocularon 3 ml del preinóculo de *S. dentisani* o *S. mutans* en el caso de los cultivos puros, y 3 ml de una mezcla de los preinóculos en proporciones iguales *S.mutans* : *S.dentisani* para los cultivos mixtos. En todos los casos, los cultivos fueron incubados en condiciones de microaerofilia. El tiempo de incubación fue de aproximadamente 16 horas, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600}$  0.6-0.8) y de 24-30 horas hasta alcanzar la fase estacionaria ( $DO_{600}$  1.2-1.5).

Con el fin de facilitar la identificación de las muestras durante el procesamiento, a cada uno de los cultivos se les adjudicó un código que se detalla en la Tabla 3.1. Tras el periodo de incubación, para obtener la biomasa celular los cultivos fueron centrifugados durante 15 minutos a 4000 rpm. Los pellets obtenidos

fueron tratados con RNA Protect (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, para estabilizar el RNA antes de su almacenaje a -20°C para su posterior extracción.

**Tabla 3.1.** Codificación para las muestras incluidas en los experimentos. Se usaron dos réplicas de cada cultivo.

Código Identificador		Cepa	Fase de Crecimiento
1.1	6.1	<i>S.mutans</i> CECT 479	estacionaria
1.2	6.2	<i>S.mutans</i> CECT 479	exponencial
2.1	7.1	<i>S.dentisani</i> 7746	estacionaria
2.2	7.2	<i>S.dentisani</i> 7746	exponencial
3.1	8.1	<i>S.dentisani</i> 7747	estacionaria
3.2	8.2	<i>S.dentisani</i> 7747	exponencial
4.1	9.1	<i>S.mutans</i> + <i>S.dentisani</i> 7746	estacionaria
4.2	9.2	<i>S.mutans</i> + <i>S.dentisani</i> 7746	exponencial
5.1	10.1	<i>S.mutans</i> + <i>S.dentisani</i> 7747	estacionaria
5.2	10.2	<i>S.mutans</i> + <i>S.dentisani</i> 7747	exponencial

### 2.1.2 Extracción de ácidos nucleicos totales, purificación y cuantificación de RNA, y eliminación de RNA ribosómico

La extracción de los ácidos nucleicos totales se llevó a cabo con el kit MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre), eluyendo en 50 µl de agua libre de RNAasa. Se realizó un doble tratamiento con DNAsa (Ambion) para la eliminación del DNA y se cuantificó el RNA obtenido con el kit RiboGreen (Invitrogen). En todos los pasos se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Por otro lado, y con el fin de eliminar RNA ribosomal (rRNA) y enriquecer la muestra en RNA mensajero, se utilizó el kit Ribo-Zero Magnetic Bacteria (Epicentre). Para ello se procesaron 26 µl del RNA total de cada una de las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se realizó la estimación de la concentración de RNA post tratamiento con Ribo-Zero asumiendo una eficiencia del 95% de eliminación (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Estimación del RNA obtenido tras el tratamiento con Ribo-Zero

MUESTRA	RNA pre RZERO (µg en 26 µl)	RNA estimado post RZERO (µg) (5%)	ng	ng/µl	ng/0,5 µl
1.1	2,90	0,15	145,08	14,51	7,25
1.2	2,67	0,13	133,58	13,36	6,68
2.1	3,38	0,17	169,07	16,91	8,45
2.2	3,08	0,15	154,12	15,41	7,71
3.1	2,62	0,13	131,17	13,12	6,56
3.2	2,52	0,13	126,23	12,62	6,31
4.1	2,19	0,11	109,46	10,95	5,47
4.2	2,07	0,10	103,61	10,36	5,18
5.1	2,16	0,11	108,23	10,82	5,41
5.2	2,47	0,12	123,37	12,34	6,17
6.1	2,41	0,12	120,38	12,04	6,02
6.2	2,60	0,13	129,81	12,98	6,49
7.1	1,86	0,09	92,95	9,30	4,65
7.2	2,51	0,13	125,71	12,57	6,29
8.1	2,67	0,13	133,64	13,36	6,68
8.2	2,31	0,12	115,64	11,56	5,78
9.1	2,37	0,12	118,69	11,87	5,93
9.2	2,16	0,11	107,90	10,79	5,40
10.1	2,47	0,12	123,37	12,34	6,17
10.2	2,50	0,13	125,13	12,51	6,26

### 2.1.3 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit de Applied Biosystems “High Capacity cDNA RT”, tal y como se especifica a continuación: Por cada muestra, se preparó una mezcla conteniendo:

Componente	Volumen (µL)
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers 2.0	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor	1
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3,2
Volumen Total	10

Este volumen final (10  $\mu$ L) se mezcló con 10  $\mu$ L del RNA obtenido tras el tratamiento con Ribo-Zero, y se programó una incubación en termociclador con las siguientes condiciones: 25°C durante 10 minutos, 180 minutos a 48°C, 5 minutos a 85°C, con un paso final a 4°C sin tiempo definido.

Para la síntesis de la cadena complementaria, a los 20  $\mu$ L obtenidos en el paso anterior se les añadió la siguiente mezcla, incubando en termociclador a 16°C durante 150 minutos:

Componente	Volumen ( $\mu$ L)
10X Buffer ligase <i>E.coli</i>	7,5
dNTPs (10 $\mu$ M)	2
RNAse H	0,2
DNA pol I	3
<i>E.coli</i> ligase	0,5
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	41,8
Volumen Total	55

Para los extremos romos se realizó un mix inicial, adicionando 2,5  $\mu$ L de T4-DNA polimerasa (3u/ $\mu$ L) y 0,7  $\mu$ L de BSA 100x y se incubó durante 30 minutos a 16°C. A continuación, se precipitó el ds-cDNA con 2 volúmenes de etanol absoluto Manteniéndolo a -20°C durante 1 hora, centrifugando a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C. El pellet obtenido se lavó con etanol al 70%, dejándolo secar por evaporación y finalmente se resuspendió en 12  $\mu$ L de agua estéril.

Los cDNAs obtenidos fueron cuantificados usando PicoGreen (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, mediante el uso de un Bioanalizador AGILENT 2100 y su metodología de electroforesis en chip, se observó tanto la calidad como el tamaño de los cDNAs, comprobando así que los fragmentos obtenidos tenían una media de tamaño de entre 100 y 200 bp.

Para la secuenciación por Illumina, las muestras fueron enviadas al servicio de secuenciación del EMBL (GeneCore, Alemania). Tras realizar las librerías, se identificaron cada una de las muestras mediante la inserción de secuencias identificativas y se cargaron en un carril de secuenciación, para la obtención de alrededor de 8 Gb de secuencia. Las secuencias obtenidas fueron anotadas tomando como referencia los genomas disponibles de las cepas de *S. dentisani* 7746 y 7747 y de *S. mutans* CECT 479. El servicio de bioinformática de FISABIO realizó la anotación mediante GLIMMER (Gene Locator and Interpolated Markov ModelER) de los genomas de las cepas de referencia (*S.dentisani* 7746, 7747 y *S.mutans*) frente a la base de datos de TIGR y Pfam, para posteriormente mapear los transcritos obtenidos.

El pipeline para el procesamiento de los resultados fue el siguiente: un paso inicial de prinseq quality filtering and trimming con los siguientes parámetros: -min\_qual\_mean 30 -ns\_max\_n 5 -min\_len 60, seguido de un primer filtrado de ribosomal y humano con bwa, a continuación se realizó un segundo filtrado de ribosomal bacteriano con megablast (con los parámetros -p 90 -e 1e-10 -b 1 -v 1). Tras este análisis, se obtuvo para cada muestra “counts” absolutos para cada uno de los ORFs de la base de datos.

Con el fin de pasar las frecuencias absolutas a relativas se realizó una primera normalización donde los “counts” de cada ORF de la base de datos en cada muestra, se dividieron por el cuantil 95% de los counts originales, de forma tal que las expresiones de los genes en las diferentes muestras tomaban valores en la misma escala numérica. Para la generación de las tablas de p-valores, dada una clasificación binaria de las muestras mediante t-test se pretendía destacar aquellos genes que presentaran una expresión diferencial estadísticamente significativa entre los 2 grupos de muestras definidos.

#### 2.1.4 Análisis de resultados

Para el análisis de los datos de expresión utilizamos el software “Statistical Analyses of Metagenomic Profiles” v2 (STAMP, Parks and Beiko, 2010). Se usaron PCAs para mostrar las diferencias entre las muestras. Para los análisis entre dos grupos de muestras, se utilizó el t-test de Welch y la corrección FDR de Storey. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia de  $q > 0.05$  (*p-value* corregido) y tamaños de efecto grandes (ratio de proporciones  $> 2$ ). Se utilizaron gráficos de barras de error extendidas para indicar la diferencia en la proporción media de genes funcionales entre dos muestras.

### 2.2 Experimentos mediante PCR cuantitativa (qPCR)

Para conocer la dinámica de crecimiento en presencia y ausencia de arginina y la capacidad de tampón de *S.dentisani* se usaron 4 medios de cultivo diferentes:

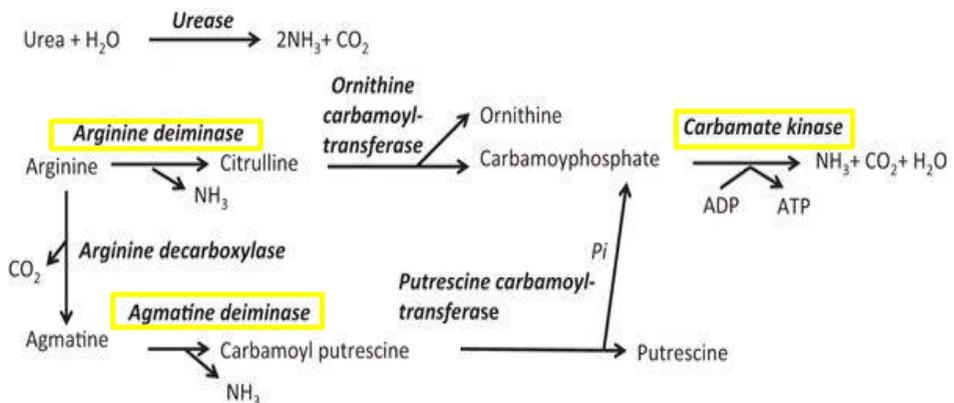
1. Caldo infusión cerebro corazón (ICC)
2. Caldo infusión cerebro corazón (ICC) con 5g/l L-arginina
3. Caldo infusión cerebro corazón (ICC) con 50 mM de HEPES ((N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid)
4. Caldo infusión cerebro corazón (ICC) con 50 mM de HEPES y 5g/l L-arginina

El HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) Sigma-Aldrich®, es un tampón biológico que a menudo se denomina tampón “Good”. Es el tampón más utilizado ya que el pKa de HEPES es 7.31, que corresponde al pH fisiológico de 7.36, además se considera que no es tóxico para las líneas celulares de cultivo.

Los cultivos se realizaron de igual manera que para los ensayos de transcriptómica, con 300 ml de medio de cultivo y 3 ml de pre-inoculo puro o

mezclado a partes iguales para los cultivos mixtos. En el caso de los cultivos mixtos, se ajustó la cantidad de inóculo para que todos los cultivos comenzaran con una densidad óptica inicial de 0.02. Para las medidas de densidad óptica y pH se tomaron 2 ml de muestra al inicio de la incubación y cada dos horas durante la curva de crecimiento. Para las extracciones de DNA y RNA se tomaron 5 ml adicionales a las 4, 8 y 13 horas.

Se diseñaron primers específicos para algunos genes clave en la ruta de la arginina de *S. dentisani* (arginina deiminasa, carbamato quinasa y agmatina deiminasa) y la subunidad beta de la ATP-sintasa (Figura 3.1). Para este último gen, fueron diseñados 2 parejas de primers. El diseño de los primers se realizó a partir del alineamiento de las secuencias de los genes de las tres cepas estudiadas generados mediante Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), implementado en el programa BioEdit (Hall, 1999).



**Figura 3.1. Resumen de vías generadoras de álcali en la cavidad oral.** En amarillo se destacan los genes de la ruta de la arginina para los cuales diseñamos primers específicos en *S. dentisani*. El gen de la ornitina carbamoil transferasa también está presente en *S. dentisani*. Gráfico de las rutas metabólicas tomado de (Liu, Nascimento and Burne, 2012)

La especificidad de todos los primers fue testada *in silico* con el programa Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) implementado en la NCBI. A continuación se detallan las secuencias de los primers diseñados para este estudio:

### **GEN AGMATINA DEIMINASA**

#### ***S. dentisani* (7746+7747)**

	Sequence (5'->3')	Length	Start	Stop	Tm	GC%
AgD_Sd_F	CAACAAGGCTGTCTTAGTGCC	21	921	941	59.46	52.38
AgD_Sd_R	CGGTCTGGGAAACACTTGCT	20	1004	985	60.54	55.00

### **GEN CARBAMATO QUINASA**

#### ***S. dentisani* (7746+7747)**

	Sequence (5'->3')	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Ck_Sd_F	GTAACCAACCGCCAGAAAGG	20	850	869	60.96	60.00
Ck_Sd_R	CCGCTTTTCGGACTCGATCA	19	926	908	59.86	57.89

### **GEN ARGININA DEIMINASA**

#### ***S. dentisani* (7746+7747)**

	Sequence (5'->3')	Length	Start	Stop	Tm	GC%
ArginD_Sd_F	GGCTTAACTGACTTGGTTGAGT	22	421	442	58.52	45.45
ArginD_Sd_F	GGGTCGCGAGTGAAGTAGAG	20	497	478	59.90	60.00

### **GEN DE LA SUBUNIDAD $\beta$ DE LA ATP SINTASA**

#### ***S. dentisani* 7746**

	Sequence 5'-3'	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Sd_betaATP_F	TATCTGCCCTTTTGGGTCGG	20	782	801	60	55
Sd_betaATP_R	CCCATTTCCGTAGCAAGGGT	20	848	829	60	55
Sd_betaATP_F 2	CCTTGGAGTTGGGTGATGGT	20	143	163	60	55
Sd_betaATP_R 2	GGCCTGTGTCCAAAACITCC	20	232	213	59	55

La PCR cuantitativa se realizó en un equipo LightCycler 480 System (Roche) usando la master mix KAPA SYBR fast qPCR Kit (Kapa Biosystems), en un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía 1  $\mu$ l de DNA, 10  $\mu$ l de la master mix, 0.4  $\mu$ l de cada primer y 7.2  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, con las siguientes condiciones

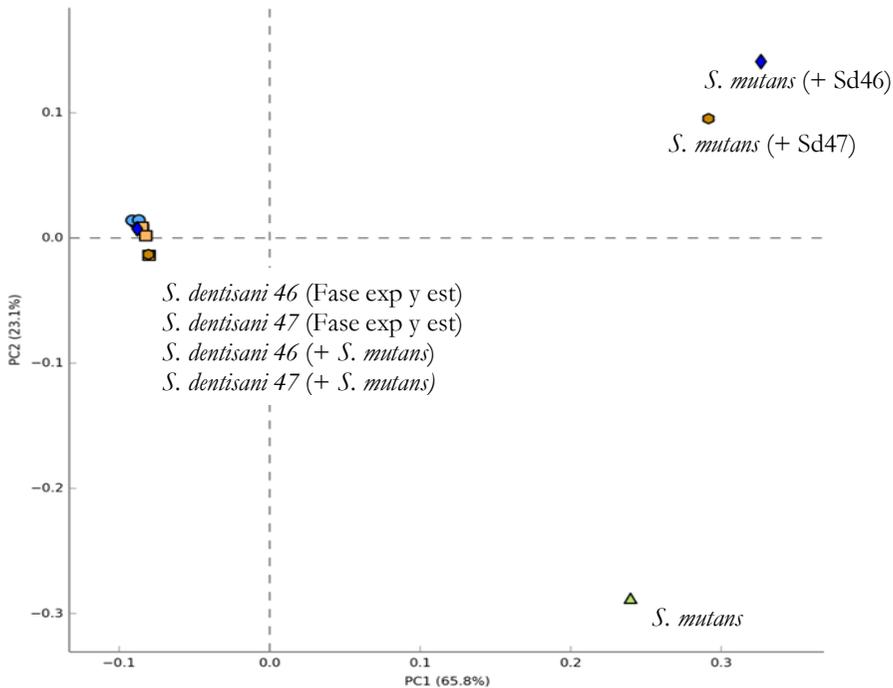
de reacción: 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 62°C y 25 segundos a 72°C, con un paso de extensión final a 72°C 10 minutos. Todas las cuantificaciones se realizaron por duplicado.

Las reacciones de qPCR se realizaron tanto para el DNA como para el cDNA, de tal manera que a partir de los valores de Cq obtenidos se pudo calcular el ratio de copias de RNAm respecto al número de copias de cada gen en la muestra (es decir, un valor de 1 indicaría una copia del transcrito por cada copia del gen). Estos valores de expresión normalizada por copia del gen en el ADN se compararon entre las condiciones (medio control, medio con arginina, medio con tampón sin arginina y medio tamponado con arginina) para estimar los cambios en expresión relativa. Previamente, los valores de Cq se transformaron en número de copias del gen mediante el uso de una recta patrón calibrada por el número de CFUs obtenido en cultivo, tal como se indica en el capítulo 1.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Ensayos de transcriptómica

Los resultados de Análisis de Componentes Principales (PCA) obtenidos tras el análisis con STAMP para los transcriptomas de *S. dentisani* 7746, *S. dentisani* 7747, *S. mutans* y las mezclas entre cepas indican que el perfil transcriptómico de *S. mutans* varía considerablemente cuando se cultiva en solitario o en presencia de *S. dentisani* (Figura 3.1). Las dos cepas de *S. dentisani* mostraron un perfil transcriptómico similar ( $R^2=0.95$ ) cuando se analizan los genes compartidos entre *S. dentisani* y *S. mutans*. Cuando se consideran todos los genes compartidos entre las dos cepas de *S. dentisani*, sí se identificaron más de 50 genes con expresión diferencial entre ambas cepas (Figura 3.2).



**Figura 3.1.** PCA obtenido tras las comparaciones de los perfiles transcriptómicos entre las cepas *S. dentisani* 7746 (Sd46), *S. dentisani* 7747 (Sd47), *S. mutans* (Sm) y las mezclas bajo todas las condiciones testadas. Se consideran los perfiles transcriptómicos de todos los genes en común entre las 3 bacterias.

La mayoría de estos genes codifican para funciones básicas de transcripción, regulación o traducción, pero también se observan algunos genes de la cápsula, de transporte de amino ácidos, de shock alcalino o de una bacteriocina, esta última por estar ausente en la cepa 7747.

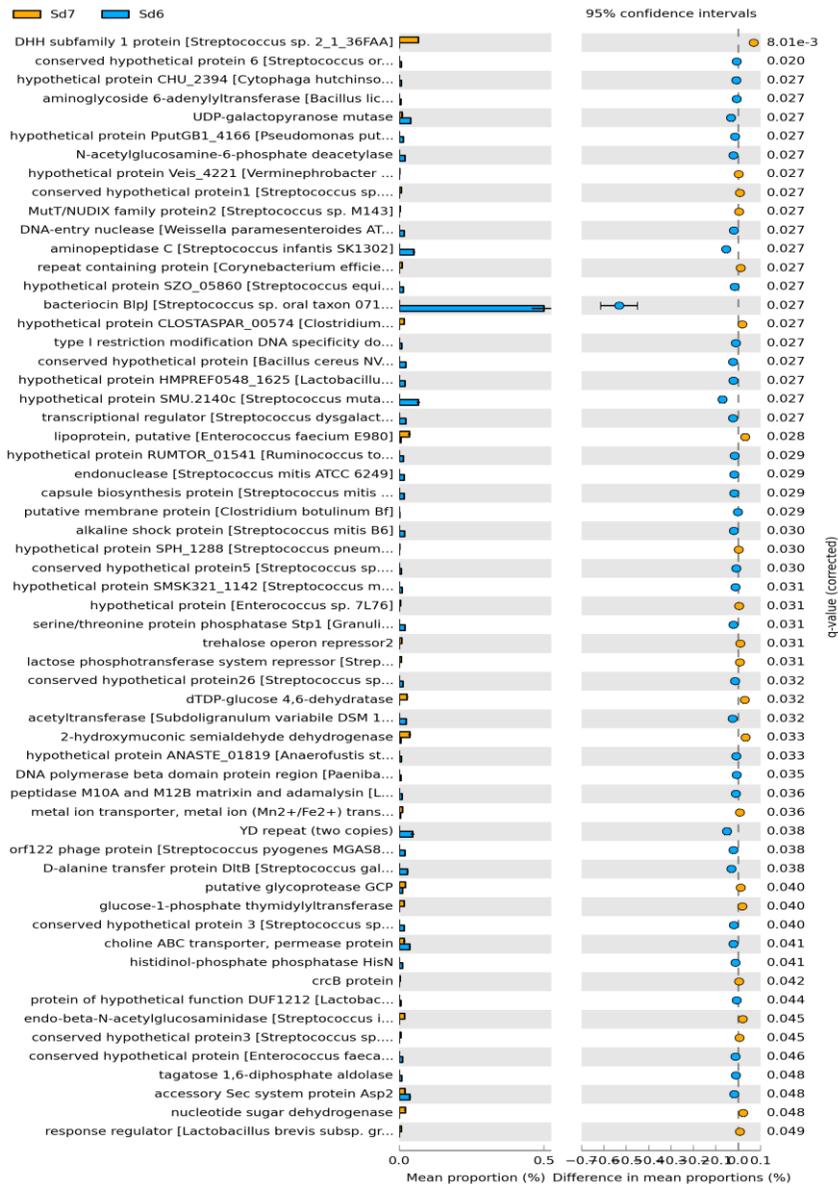
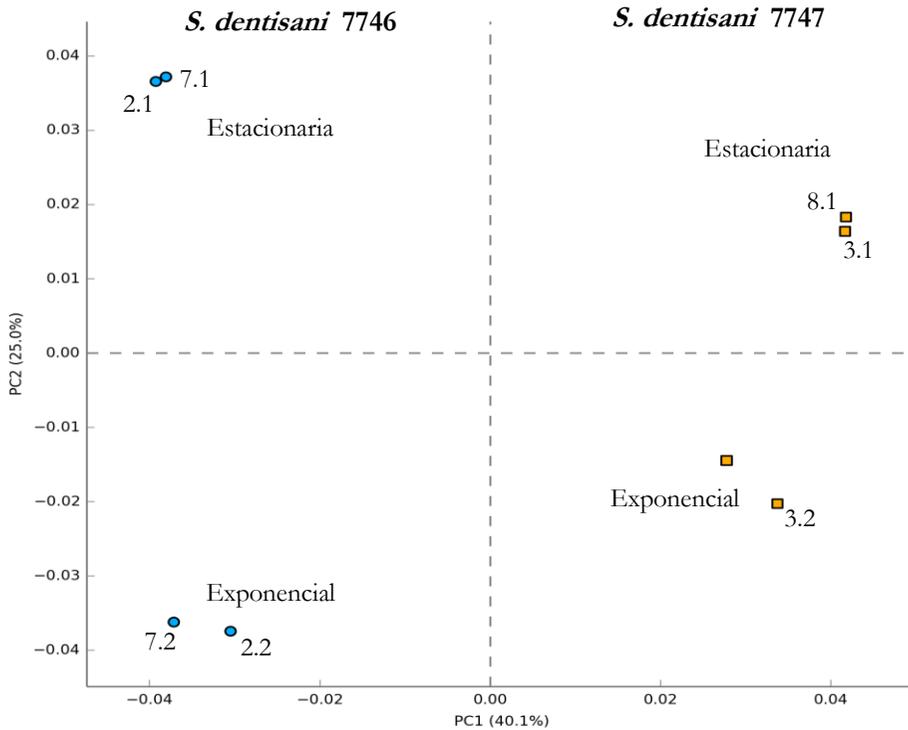


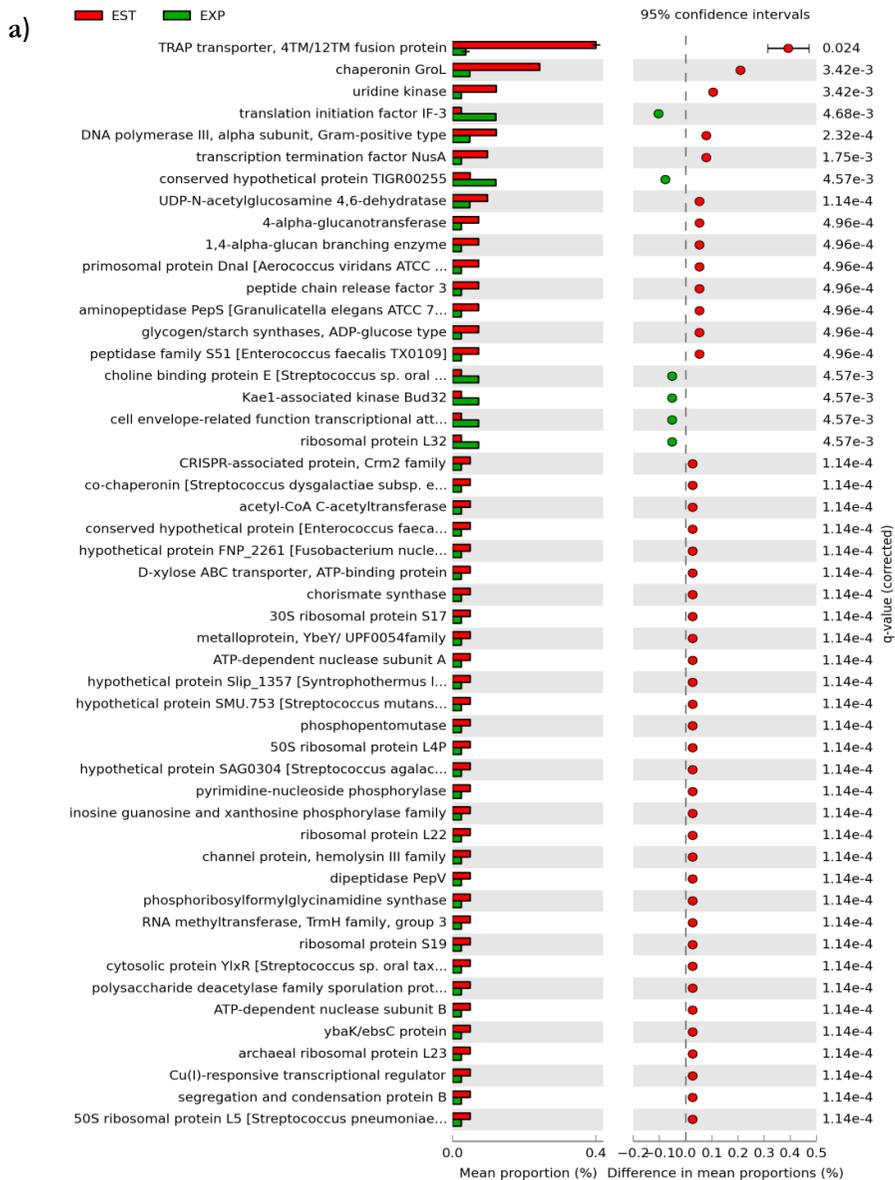
Figura 3.2. Lista de genes con expresión diferencial entre las cepas 7746 y 7747 de *S. dentisani* crecidas en cultivo puro, combinando los datos de fase estacionaria y fase exponencial.

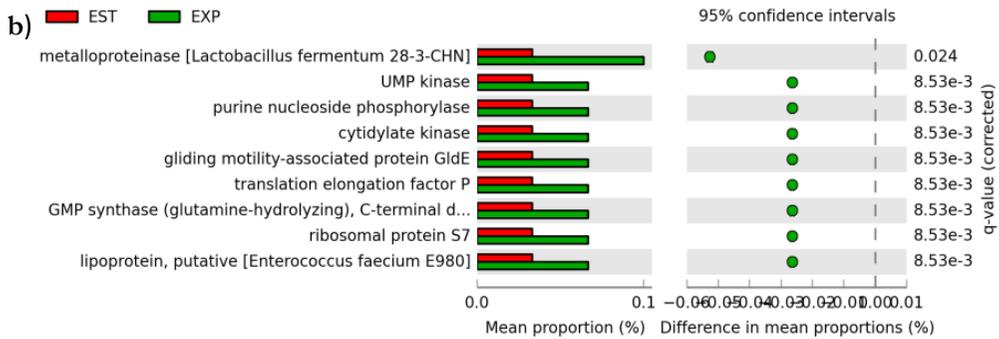


**Figura 3.3.** Comparación de los perfiles transcriptómicos entre las cepas *S. dentisani* 7746 y *S. dentisani* 7747 en fase exponencial y estacionaria. Los números hacen referencia a los códigos de cada experimento mostrados en la Tabla 3.1. La gráfica muestra que las réplicas biológicas se agrupan entre sí, y que se observan diferencias en el perfil de expresión entre las dos fases de crecimiento.

Cuando comparamos los perfiles transcriptómicos de las dos cepas de *S. dentisani* entre sí, aunque los perfiles son similares, se observan cambios significativos en genes concretos que pueden tener relevancia biológica y que vale la pena destacar. Al realizar un PCA únicamente con los perfiles transcriptómicos de las dos cepas de *S. dentisani* (Figura 3.3) observamos que el componente principal del análisis separa dichas cepas, mientras que el componente secundario separa claramente el perfil transcripcional de ambas cepas en fase exponencial (valores negativos a lo largo del eje) con la fase estacionaria (valores positivos). Sin embargo, los valores de expresión de la mayoría de los genes son muy similares entre ambas fases ( $R^2=0.94$ ) y cuando

miramos los genes con expresión diferencial entre la fase exponencial y estacionaria, únicamente 9 de ellos muestran cambios significativos en la cepa 7747, y más de 50 en la cepa 7746 (Figura 3.4).

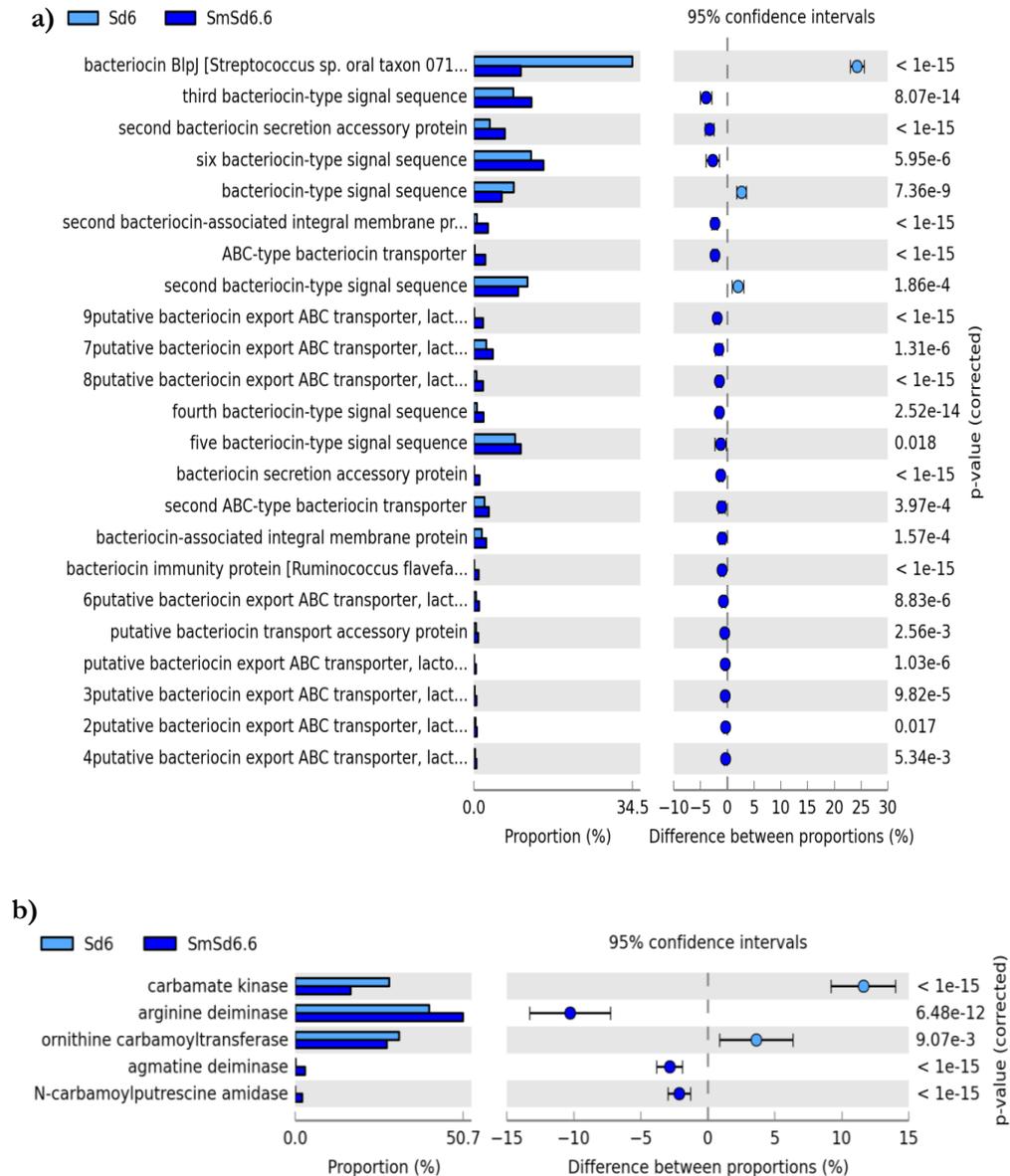




**Figura 3.4.** Cambios significativos en el perfil de expresión de *S. dentisani* cepas a)7746 y b)7747 entre las fases exponencial y estacionaria de crecimiento.

Éstos incluyen una metaloproteína, una lipoproteína, chaperonas o genes de proteínas ribosomales, entre otros. Es interesante que ni los genes de la ruta arginológica, ni los de síntesis de bacteriocinas cambian de forma significativa en ambas fases de crecimiento. Por otro lado, en los perfiles transcriptómicos de *S. dentisani* crecida en solitario y en cultivo mixto con *S. mutans*, se observa un patrón similar (Figura 3.1). Para profundizar en las posibles diferencias de interés aplicado, decidimos estudiar en detalle los cambios de expresión de los genes de la ruta arginológica y de las bacteriocinas en la cepa 7746, dado que la cepa 7747 no tiene la isla de bacteriocinas ACDC (Capítulo 2). Los datos se muestran en la Figura 3.5, y muestran una sobreexpresión de la mayoría de los péptidos señal, transportadores ABC y genes codificantes de bacteriocinas en el cultivo mixto comparado con el cultivo de *S. dentisani* en solitario. Por último, observando la expresión de los genes que forman parte de la ruta de la arginina se observa una clara sobre-expresión de los genes principales de la ruta -como la agmatina deiminasa o la arginina deiminasa- en presencia de *S. mutans*, aunque el gen de la ornitina carbamoiltransferasa está algo sobreexpresado en el cultivo puro (Figura 3.4b). Por tanto, la sobreexpresión de la ruta podría deberse a la interacción con *S. mutans*, bien por contacto directo con las células o por señales presentes en el medio de cultivo (por ejemplo una mayor acidificación). Para

estudiar de una manera más fina la posible activación de la ruta arginólítica, se cuantificó la expresión de los genes de dicha ruta mediante PCR en tiempo real.

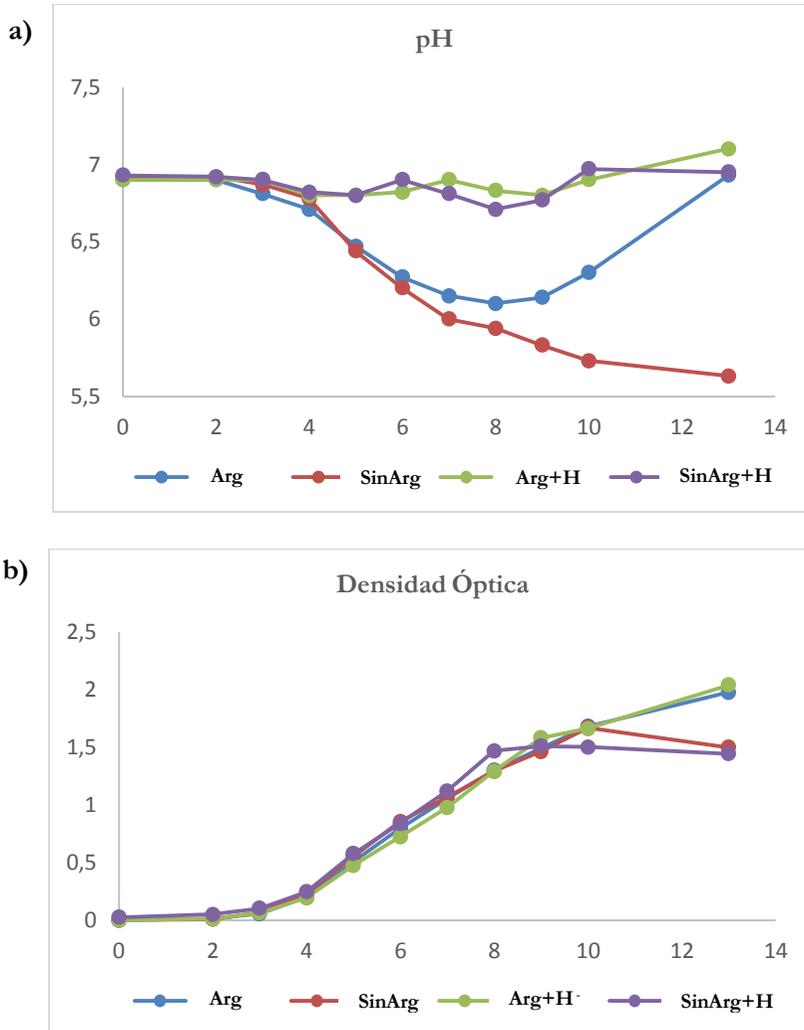


**Figura 3.5** Comparación entre los perfiles transcriptómicos de la cepa *S. dentisani* 7746 crecida en cultivo puro o en cultivo mixto con el patógeno oral *S. mutans*. **a)** genes de péptidos antibacterianos; **b)** genes de la ruta de la arginina. Los colores indican los genes de *S. dentisani* cultivado en solitario (azul claro) y en presencia de *S. mutans* (azul oscuro).

### 3.2 Experimentos de PCR cuantitativa (qPCR)

Estos experimentos se realizaron únicamente para la cepa 7746. Durante las 6 horas iniciales de incubación, el crecimiento parece estar impulsado por los azúcares presentes en el medio ICC en todas las condiciones, ya que las curvas de crecimiento obtenidas en base a las mediciones de densidad óptica son prácticamente idénticas (Figura 3.6). A partir de ese momento, la presencia de arginina en el medio de cultivo resultó en una mayor carga celular comparado con las dos condiciones donde el medio no se suplementó con arginina. Concomitantemente con el aumento en la densidad óptica debido al crecimiento celular, el pH del cultivo cayó de 7 a aproximadamente 6.4 en los cultivos que carecían de HEPES, independientemente de la presencia de arginina en el medio de cultivo. Poco después de completar esta primera fase, en el cultivo que contenía arginina, el pH comienza a aumentar, presumiblemente debido a la acumulación del amoníaco producido por la utilización de arginina, alcanzando el valor de pH inicial 24 h después de la inoculación. Por el contrario, en el medio sin arginina y sin HEPES añadido, el pH disminuyó continuamente hasta alcanzar un valor de aproximadamente 5.6 después de 24 h de incubación. En los medios modificados con HEPES, el pH se estabilizó a aproximadamente 7 a lo largo de la curva de crecimiento, mientras que las mediciones a O.D. 610 fueron similares a los medios sin HEPES, con un valor máximo de alrededor de 2 después de 13 horas de inoculación, indicando que la adición de este tampón no tuvo un efecto negativo en el crecimiento de la bacteria. Los datos muestran por tanto que *S. dentisani* 7746 es capaz de tamponar el pH extracelular en presencia de arginina, que esta activación tiene lugar cuando el pH está por debajo de 6.4, y que la presencia de arginina mejoró la densidad celular. Para estudiar los cambios de expresión en los genes clave involucrados en esta ruta arginolítica, se realizó PCR cuantitativa en tiempo real con primers específicos de dichos genes, en ARN extraído a las 4 horas de crecimiento (valor basal), 8

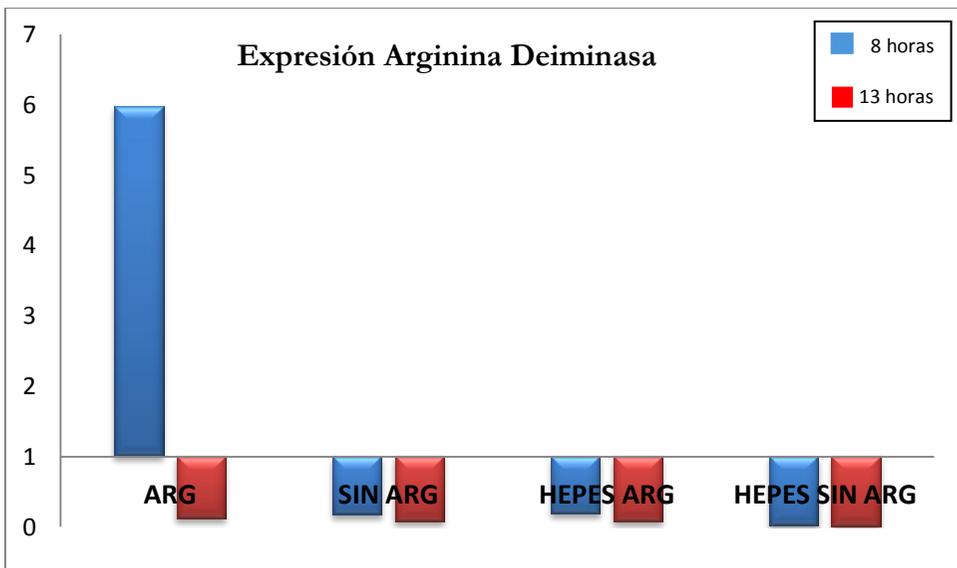
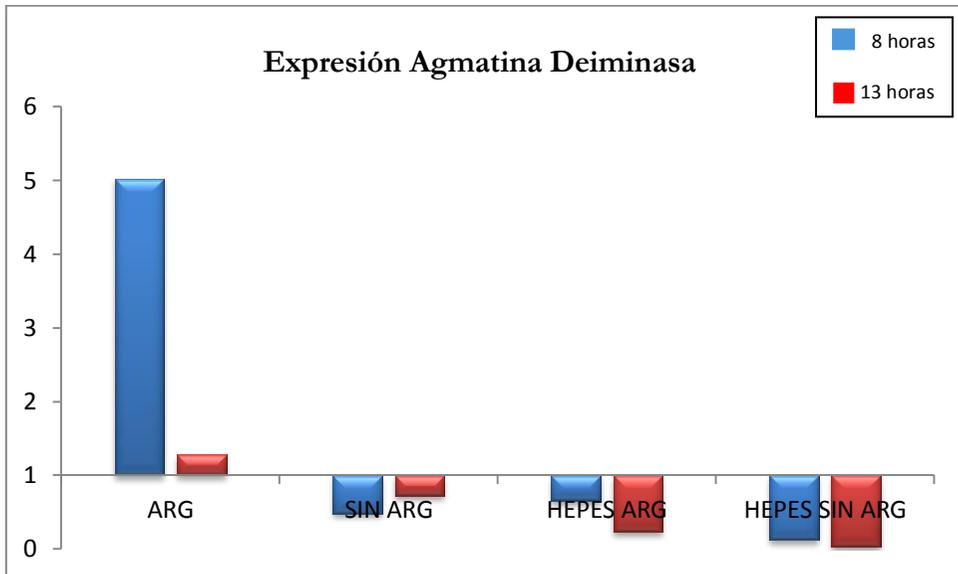
horas (mínimo de pH) y 13 horas (recuperación de pH neutro).

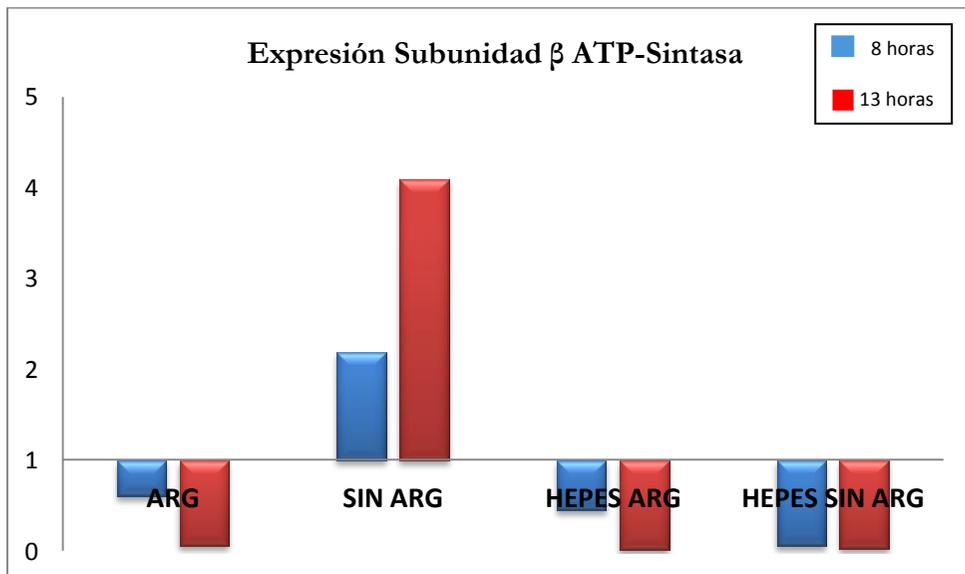
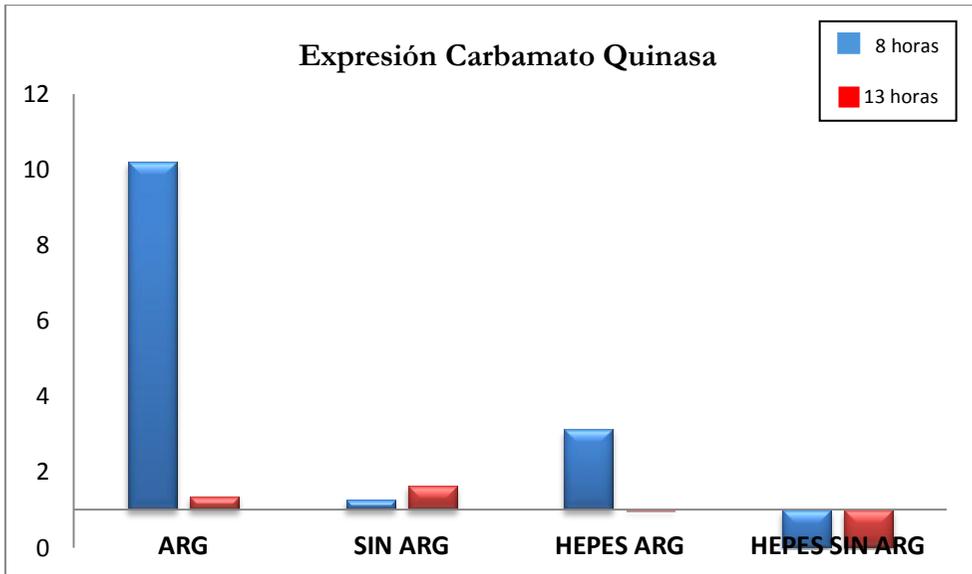


**Figura 3.6.** Dinámica de a) pH b) crecimiento bacteriano medido en densidad óptica en medios de cultivo Con arginina (Arg), Sin arginina (SinArg), Con arginina y tampón HEPES (Arg+H) y Sin arginina y con tampón HEPES (SinArg+H). El eje X muestra el número de horas transcurrido desde la incubación.

En la Figura 3.7 se muestra la cuantificación relativa de los genes clave involucrados en la utilización de la arginina a través de la vía ADS (arginina deiminasa, carbamato quinasa y agmatina deiminasa), así como la subunidad

beta de la ATP-Sintasa en las cuatro condiciones de cultivo evaluadas.





**Figura 3.7.** Cuantificación relativa (ratio de expresión entre las 8 ó 13 horas y el valor de referencia a las 4 horas) mediante qPCR de la expresión génica en cultivos de *S. dentisani* bajo distintas condiciones. Se determinaron los cambios de expresión en los genes agmatina deiminasa, arginina deiminasa, carbamato quinasa y la subunidad β ATP-Sintasa. Todos los resultados se expresan teniendo como referencia de valor basal la cuantificación medida transcurridas 4 horas después de la inoculación.

Cuando la arginina estaba presente en el medio de cultivo, los genes relacionados con la vía ADS se sobre-expresaron a las 8 horas entre 4 y 10 veces en relación a los valores basales (Figura 3.7). En ausencia de arginina, el pH del medio se redujo continuamente hasta alcanzar un valor de alrededor de 5,5, pero los genes de la vía ADS no se activaron, sugiriendo que la presencia de arginina en el medio no es suficiente para sobre-expresar esta ruta, sino que un pH ácido también es necesario. Esto se confirma en los medios que contenían tampón HEPES, ya que al estar el pH del medio tamponado, independientemente de la presencia de arginina, la expresión de los genes de la ruta arginolítica también se redujo, señalando que el pH es el principal factor que afecta la activación de la vía arginolítica en la cepa 7746 de *S. dentisani*. En cuanto a la subunidad  $\beta$  ATP-sintasa involucrada en la protección del medio ambiente intracelular de los efectos dañinos de la acidificación, solo se expresó en exceso (entre 2 y 4 veces) en el medio que carecía de arginina y HEPES, donde el pH disminuyó por debajo de 6, sugiriendo que en ausencia de arginina, la bacteria activa esta ruta para mantener su pH intracelular activando esta bomba de protones.

## 4. DISCUSIÓN

El genoma de *S. dentisani* 7746 y 7747 revela la presencia de la ruta arginológica completa, y los experimentos de transcriptómica del presente capítulo confirman que dicha ruta es funcionalmente activa. Por tanto, *S. dentisani* expresa genes de regulación del pH y de las dos rutas principales para la generación de sustancias álkali, *S. dentisani* no contiene ningún gen de la ureasa; sin embargo, los datos muestran que ambas cepas de *S. dentisani* (7746 y 7747) tienen genes funcionales activos de las siguientes enzimas que forman parte de la ruta de la arginina: Arginine deiminase (*arcA* - locus tag HK29\_RS02275), Carbamate kinase (*arcC* - locus tag HK29\_RS02285) y Ornithine carbamoyltransferase (*arcB* - locus tag HK29\_RS02280). Con posterioridad a este trabajo, más cepas de *S. dentisani* han sido secuenciadas por otros grupos de investigación, y un análisis filogenómico del grupo Mitis reveló que una de las características del clúster *dentisani* es precisamente la presencia de genes de la ruta arginológica, ya que éstos no están presentes en los clústers más cercanos, que son los del grupo *tigurinus* y *oralis* (Jensen, Scholz and Kilian, 2016). Esta capacidad tamponadora del pH ácido fue inesperada y representa una capacidad beneficiosa extraordinaria, al poder combatir el pH ácido, que es la causa primaria de la desmineralización del esmalte. Por tanto, a la capacidad antimicrobiana de *S. dentisani* 7746 y 7747 descrita en el capítulo 2, debemos añadir la capacidad tamponadora o antiácida. Tras la finalización de esta tesis, nuestro equipo ha descrito una tercera capacidad potencialmente beneficiosa de la cepa 7746, como es la anti-inflamatoria, medida en cultivos celulares de células gingivales (Ferrer *et al.*, bajo revisión).

Los resultados de este capítulo revelan los genes expresados en el genoma de *S. dentisani* en fase exponencial y estacionaria, entre los cuales destacan la presencia de bacteriocinas, algunas de las cuales se sobreexpresan en presencia de *S. mutans*. Sin embargo, una limitación de ese experimento es que desgraciadamente no medimos las características del medio de cultivo en estos cultivos mixtos (como por ejemplo el pH), de tal manera que no podemos determinar si la activación de las bacteriocinas se debe al contacto físico con células de *S. mutans* o directamente a señales externas como el pH ácido. Por ello, trabajos futuros deberán determinar las señales que activan y reprimen las bacteriocinas de *S. dentisani*, a fin de caracterizar la regulación de la isla de bacteriocinas ACDC descrita en el capítulo anterior. Ello podría tener no sólo interés básico para entender la regulación de esta estrategia defensiva de la bacteria, sino también práctica, al determinar las condiciones en las cuales se pueden producir los péptidos con mayor eficiencia. En cualquier caso, el trabajo de este capítulo apoya la idea de que las moléculas inhibidoras de *S. mutans* son péptidos, tal como se sugiere en el capítulo 2, y además que hay más de una bacteriocina presente y activa en el genoma del probiótico. Uno de los objetivos de este trabajo era determinar si las bacteriocinas anti-caries se expresaban en mayor medida en fase estacionaria, dado que habíamos observado mayor inhibición al utilizar el sobrenadante recogido en estas condiciones. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de genes de bacteriocinas entre las dos fases de crecimiento. Ello sugiere que las bacteriocinas pueden expresarse de forma constitutiva (constante), lo cual indica que la mayor inhibición en fase estacionaria no se debe a una mayor expresión de las bacteriocinas en esta fase, sino a una mayor densidad celular y por tanto mayor producción total de bacteriocina. A efectos prácticos, esto implica que el cultivo de esta bacteria permite producir las sustancias inhibidoras en su sobrenadante y que a mayor densidad celular, mayor cantidad de las mismas. De hecho, aparte

del uso de la bacteria viva como probiótico, una segunda estrategia preventiva frente a la caries podría ser la producción a gran escala de los péptidos, y su aplicación en productos de higiene bucodental como pastas de dientes o enjuagues bucales, tal como se propone en el capítulo anterior.

Por un lado, se logró evidenciar que cuando se cultivaba *S. dentisani* 7746 suplementado con 5 g/l de L-arginina, la bacteria es capaz de amortiguar de manera eficiente el pH extracelular en presencia de arginina, pero únicamente cuando el pH es ácido. Es decir, cuando el pH se tamponó mediante el tampón HEPES, los genes arginolíticos no se sobreexpresaron ni siquiera en medio de cultivo con arginina. Este aspecto es muy importante, porque indica que el sistema se autoregula y solamente se activa cuando el pH baja por debajo de un umbral crítico, que en base a las curvas de pH parece situarse por debajo de pH 6.5.

Para ambas cepas, la arginina deiminasa híbrida con la de *S. gordonii* con igual homología y longitud. La homología y longitud de hibridación para las otras dos enzimas es diferente en cada cepa. En *S. gordonii*, la ruta de la arginina se expresa en condiciones de stress o de pH ácido (Liu and Burne, 2009), lo que concuerda con los datos de este capítulo, los cuales sugieren que el ácido puede ser la señal que active la ruta en *S. dentisani* también. De hecho, este gen se sobreexpresa en presencia de *S. mutans* en nuestros experimentos, lo cual puede deberse a la detección de la presencia del patógeno, pero más probablemente al ambiente ácido que éste genera. También se observó actividad génica de los genes Agmatin deiminasa y N-carbamoylputresceína amidasa, pero a unos niveles de expresión muy bajos, indicando que la ruta principal de producción de amonio es la ruta de la arginina deiminasa. Es interesante que en organismos acidogénicos patógenos como *S. mutans*, el sistema de regulación del pH es intracelular, mediante la activación de bombas de membrana que expulsan los

protones al exterior. Esta estrategia mantiene o acidifica aún más el pH del ambiente, y de esta forma las bacterias acidogénicas de la placa dental se ganan la exclusividad del nicho, desplazando a otras bacterias de la comunidad microbiana (Marsh, 1994). Aparte de la activación de la bomba de protones, el genoma de *S. mutans* experimentó un importante cambio de expresión cuando se cultivó en solitario o en presencia de *S. dentisani* (Figura 3.1), pero al no ser el objetivo de este capítulo, este cambio transcripcional no se ha analizado en detalle, y deberá ser estudiado en profundidad en el futuro. *S. dentisani*, por otro lado, tiene una estrategia tamponadora extracelular, la cual es más beneficiosa para mantener una homeostasis microbiana en la placa, neutralizando los ácidos orgánicos generados y por tanto reduciendo el tiempo de exposición del esmalte a la acción desmineralizante del pH ácido. De hecho, en nuestros ensayos de qPCR. *S. dentisani* 7746 sólo activó la bomba de protones en ausencia de arginina y cuando el pH era ácido, sugiriendo que esta estrategia es secundaria cuando la opción arginolítica no es suficiente.

La actividad arginolítica de *S. dentisani* abre la posibilidad de combinar su aplicación con productos que contengan arginina, como las pastas de dientes (Ástvaldsdóttir *et al.*, 2016), o incluso con productos intermedios de la ruta arginolítica, como la citrulina, que *S. dentisani* también puede transformar en amonio. El trabajo futuro deberá determinar en más detalle si otras cepas de *S. dentisani* tienen la misma capacidad y regulación, y si la acción combinada del probiótico con arginina tiene un efecto sinérgico que apoye su uso conjunto.

## CAPÍTULO 4

### APTITUD TECNOLÓGICA

---



## 1. INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han generado directrices, con criterios y metodologías que permiten evaluar la eficacia de posibles probióticos que estén en estudio. Así mismo, han identificado y definido la información que debe estar disponible para justificar, en forma precisa, las declaraciones de propiedades saludables para un probiótico. Todo ello reconoce la necesidad de obtener datos científicos sólidos, a fin de establecer los beneficios para la salud que se derivan de estos probióticos.

Se entiende por declaración de propiedades saludables, una declaración en la que se describe la relación del probiótico propuesto, con una enfermedad o un estado de salud. Esa declaración, debe basarse en un conocimiento bien establecido y generalmente aceptado, de datos registrados en publicaciones científicas y/o recomendaciones de los organismos competentes (FAO, 2006). Para ello, deben realizarse estudios *in vitro* apropiados, que establezcan los posibles beneficios de los probióticos para la salud, antes de emprender ensayos *in vivo*. Las pruebas deben llevarse a cabo, según el beneficio previsto para la salud que pueda conferir el probiótico (Collins, Thornton and O'Sullivan, 1998; Havenaar and Huis in't Veld, 1992), siendo de utilidad para adquirir conocimiento sobre las cepas y el mecanismo del efecto probiótico. Sin embargo, no son totalmente adecuados para predecir la funcionalidad de los microorganismos probióticos en el cuerpo humano. Los probióticos para uso humano, requerirán finalmente la confirmación de su eficacia con ensayos en seres humanos.

Dentro de los principales ensayos *in vitro* que se utilizan actualmente para el estudio de cepas probióticas, se encuentran entre otros:

- La resistencia al ácido gástrico y a las sales biliares
- La adherencia a mucosas y/o a células epiteliales humanas y líneas celulares
- La actividad antimicrobiana contra potenciales bacterias patógenas
- La capacidad para reducir la adhesión de agentes patógenos a superficies
- Y la actividad hidrolasa de sales biliares

Históricamente, los *lactobacillus* y las *bifidobacterias* asociadas con alimentos, han sido considerados como inocuos (Adams and Marteau, 1995). Su aparición como comensales normales en la flora mamífera y su establecido uso inocuo en una diversidad de alimentos y productos suplementarios en todo el mundo apoyan esa conclusión. Sin embargo, los probióticos pueden, teóricamente, ser responsables de cuatro tipos de efectos colaterales (Marteau, 2001):

- Infecciones sistémicas
- Actividades metabólicas perjudiciales
- Excesiva estimulación inmune en individuos susceptibles
- Transferencia de genes

Aunque las bacterias objeto de estudio sean consideradas como inocuas, Generally Regarded As Safe (GRAS). Se recomienda que las cepas probióticas sean caracterizadas por lo menos con los siguientes ensayos:

- Determinación de los patrones de resistencia a los antibióticos
- Evaluación de ciertas actividades metabólicas (por ejemplo, producción de D-lactato o desconjugación de sales biliares)
- Evaluación de efectos colaterales durante estudios en seres humanos

- Supervisión epidemiológica de incidentes adversos en los consumidores (después de la comercialización)
- Si la cepa en estudio pertenece a una especie que se sabe que produce toxinas con efectos sobre mamíferos, debe realizarse un ensayo para determinar la producción de toxina. Un posible esquema para el ensayo de la producción de toxinas fue recomendado por el EU Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN, 2000)
- Si la cepa en estudio pertenece a una especie con conocido potencial hemolítico, se requiere la determinación de la actividad hemolítica.

Por lo que respecta a las pruebas *in vivo*, deberían emprenderse ensayos aleatorios de doble ciego, controlados con placebo, para determinar la eficacia del producto probiótico. Con el fin de averiguar si un probiótico determinado puede prevenir o tratar una infección patógena específica, debe proyectarse un estudio clínico para verificar la exposición a dicho patógeno (estudio preventivo), o si el microorganismo que causa la infección es ese patógeno específico (estudio de tratamiento).

Cuando se utilizan microorganismos probióticos a fin de conferir al huésped beneficios para la salud, deben indicarse los regímenes de dosificación y duración, recomendados por el fabricante de cada cepa o producto, en base a datos científicos y según la normativa vigente en el país donde se comercializará el probiótico. Estos datos deberían, siempre que sea posible, ser el resultado de estudios *in vitro*, en animales (cuando sea pertinente) y en seres humanos.

En el caso de algunas bacterias ácido lácticas, usadas frecuentemente como probióticos, existen algunas resistencias a los antibióticos (Salminen *et al.*, 1998). Estas resistencias, pueden estar relacionadas con genes localizados en el cromosoma, plásmidos o transposones. Sin embargo, no se dispone de

información suficiente sobre las circunstancias en que podrían mobilizarse estos elementos genéticos, y si podrían generar un problema clínico. Existe por ello preocupación por la utilización de bacterias probióticas que contienen genes específicos, resistentes a medicamentos, ya que no deberían utilizarse en la industria alimenticia bacterias que contengan genes transmisibles de resistencia a medicamentos. Por ello, los expertos recomiendan la necesidad de elaborar ensayos normalizados, que establezcan perfiles de sensibilidad o resistencia a los medicamentos, en bacterias de géneros frecuentemente usados como probióticos, como son los lactobacilos o bifidobacterias.

Por todo ello, y dado que el objetivo principal de esta tesis, es proponer las cepas de *Streptococcus dentisani* 7746 y 7747 como posibles probióticos para la salud oral, era necesario determinar las posibles resistencias a antibióticos, así como la presencia de elementos móviles asociados. Desde el punto de vista de la actividad probiótica, como es el caso de la inhibición, también es deseable optimizar las condiciones a las cuales se produce esa inhibición, puesto que si se pretende usar estas cepas como potenciales cepas probióticas, es necesario conocer los medios y condiciones de cultivo necesarios que favorezcan este proceso.

Por un lado, el pH es un parámetro crítico en el cultivo de microorganismos ya que estos sólo pueden crecer en un rango estrecho de pH. Por otro lado, el patrón de crecimiento bacteriano se ve profundamente influenciado por la temperatura, ya que la temperatura de crecimiento óptimo permite el crecimiento más rápido de las bacterias durante un período de tiempo menor.

La temperatura máxima de crecimiento es la temperatura más elevada a la cual es posible el crecimiento. Es común considerar que la temperatura óptima de crecimiento sea la que permita obtener la mayor cantidad de células bacterianas

viabiles, por encima de esa temperatura la velocidad de crecimiento disminuye con rapidez.

Es esencial poder identificar el medio de cultivo bacteriano adecuado, que nos permita obtener mayor masa celular, ya que el proceso de crecimiento bacteriano debe estar optimizado, buscando obtener la mayor cantidad de agente inductor posible, con el mínimo posible de gastos. Esto favorecería la producción de la cepa a gran escala.

En la actualidad los medios de cultivo se definen como el conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Puesto que la diversidad metabólica de los microorganismos es enorme, la variedad de medios de cultivo es también muy grande.

Un medio de cultivo adecuado, para conseguir optimizar el crecimiento bacteriano de una especie concreta, ha de contener, como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. Siempre han de estar presentes las sustancias adecuadas para ejercer de donantes o captadores de electrones para las reacciones químicas que tengan lugar. Todas estas sustancias se suministraban originalmente en forma de infusiones de carne, extractos de carne o extractos de levadura. Actualmente, la forma más extendida de aportar estas sustancias a los medios es utilizar peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón ya que la mayoría de los microorganismos, que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno presentes en la peptona.

Ciertas bacterias tienen necesidades nutritivas específicas por lo que se añade a muchos medios sustancias como suero, sangre, líquido ascítico, etc. Igualmente pueden ser necesarios ciertos carbohidratos y sales minerales como las de calcio, magnesio, manganeso, sodio o potasio y sustancias promotoras del crecimiento, generalmente de naturaleza vitamínica.

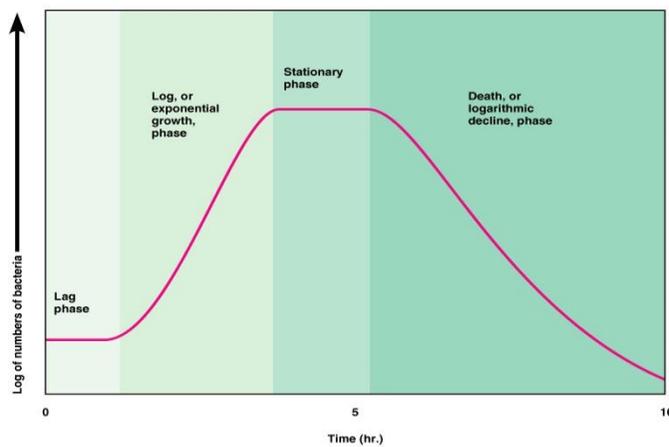
Con fines enfocados a la producción a gran escala de las cepas de *S. dentisani*, se requería determinar el medio de cultivo bacteriano que permitiera un mejor crecimiento de las cepas, para finalmente obtener mayor volumen de biomasa celular. A efectos del producto final que quiere comercializarse y para que el coste del probiótico se abarate sustancialmente, se necesita un medio de cultivo optimizado que provea los requerimientos nutricionales necesarios, para que las cepas puedan crecer en óptimas condiciones, bajo el pH y temperatura adecuados. Por ello, durante la realización del presente capítulo probamos 6 medios de cultivo diferentes, con el fin de determinar cuál de ellos era el más adecuado para la producción de *S. dentisani*.

Sin embargo, no debemos olvidar que no solo es imprescindible un medio de cultivo apropiado, sino que también la fase de crecimiento adecuada. Por ello, es importante recordar algunos conceptos básicos, uno de ellos, el denominado crecimiento microbiano, donde se produce un aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo en una población. El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos, este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular.

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado denominado tiempo de generación ( $\tau$ ). Los tiempos de generación de bacterias creciendo en

ambientes favorables pueden ser muy cortos (valores de  $\tau$  de 20 min). Esto lleva a que una única célula ( $N_0 = 1$ ) creciendo con un  $\tau = 20$  min, llegue a poder producir  $4.7 \times 10^{21}$  células en 24 horas.

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Fases de crecimiento bacteriano (Latencia, Exponencial, Estacionaria y Muerte celular)

Las curvas de Crecimiento Microbiano constan de 4 etapas bien definidas, aunque el tiempo de duración de cada una de estas etapas puede variar según el tipo de microorganismo.

- **Fase de Latencia:** Corresponde a un período de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase no hay incremento en el número de células, aunque sí una gran actividad en el metabolismo.
- **Fase de Crecimiento Exponencial:** Período en que el crecimiento del microorganismo ocurre de forma exponencial, es decir, cada vez que pasa un determinado tiempo la población se duplica.

- **Fase Estacionaria:** Período en que ocurren las limitaciones del crecimiento, ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos o por una combinación de las causas anteriores.
- **Fase de Muerte:** Tras culminar la fase estacionaria, comienza una progresiva disminución en el número de células viables. Cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

Uno de nuestros mayores objetivos era determinar el mecanismo por el cual la cepa de *S. dentisani* provoca una inhibición en el crecimiento de bacterias cariogénicas, como *S. mutans* o *S. sobrinus*. Pero antes de ello, un factor determinante es la identificación de las condiciones de cultivo óptimas para generar la mayor inhibición, ligadas o no, a las fases de crecimiento bacteriano.

Desde otro punto de vista, si lo que se busca es proponer las cepas de *Streptococcus dentisani* sp. nov, como un posible probiótico que pudiera ser adicionado a alimentos funcionales de origen lácteo, es necesario determinar la masa celular obtenida tras incubar las cepas en medio lácteo, ya que es vital observar si las bacterias crecen bien bajo las propiedades físico-químicas de la leche, como el pH, el contenido en gramos por litro de agua, materia grasa, caseína, albumina y lactosa. Esta última es muy importante ya que las cepas 7746 y 7747 han demostrado su capacidad de fermentación de la lactosa. Ello implica que al inocularse en leche, la bacteria produzca ácido láctico a partir de lactosa, favoreciendo que el porcentaje de acidez suba y el pH baje.

Existe actualmente una preocupación latente por la utilización bacterias probióticas que contengan posibles genes de resistencia a medicamentos, pues el uso masivo de probióticos podría contribuir a la expansión de estos genes de

resistencia. Es por ello que no deberían utilizarse en alimentos bacterias que contengan genes transmisibles de resistencia a medicamentos.

En la actualidad, se disponen de herramientas que permiten determinar si una especie bacteriana posee propiedades de resistencia a antibióticos determinado. Una de ellas es *in silico*, donde por medio de la comparación entre bases de datos y el genoma de la especie en cuestión se determina sus propiedades de resistencia o sensibilidad a los agentes antimicrobianos, además de los ensayos normalizados para establecer perfiles de insensibilidad o resistencia a los medicamentos.

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar un día a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se determina la concentración inhibitoria mínima (CMI) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado.

La autoridad europea de seguridad alimentaria EFSA especifica las directrices relacionadas con la presencia indeseable de genes de resistencia antimicrobiana que puedan ser transmisibles. En la base de datos de genes de resistencia a antibióticos (Antibiotic Resistance Genes Database ARDB) se recogen más de 375 genes de resistencia a antibióticos, resistencia que viene codificada para cerca de 250 antimicrobianos.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de un agente antimicrobiano, es la mínima concentración requerida para inhibir la multiplicación y producción de

un crecimiento visible de una cepa determinada. La determinación se realiza mediante la incubación de una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Utilizando los criterios de interpretación del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), los resultados se pueden interpretar como susceptible, intermedio o resistente.

Las pruebas de la CMI pueden ser realizadas en medios de cultivo sólidos o líquidos, para determinar la CMI de un antibiótico para una bacteria por técnicas de dilución se prepara una serie de tubos con una cantidad determinada de caldo de cultivo en cada uno, a los que incorpora una cantidad de antibiótico creciente de modo que se obtengan concentraciones dobles progresivas; al terminar el ensayo se podrá ver que el caldo estará transparente en los tubos donde exista inhibición en el crecimiento del microorganismo.

La seguridad de los microorganismos usados como probióticos es un tema prioritario. Ya que el objetivo principal es generar un efecto beneficioso en quien los utilice, sin que causen efectos secundarios no deseados. Para ello, es necesario evaluar en los posibles probióticos la capacidad que tengan de producir ciertos metabolitos secundarios no deseados, que podrían en algún momento provocar un efecto contrario al buscado y favorecer condiciones de enfermedad. La producción de ácido D-láctico (que pueda generar acidosis), la hidrólisis de sales biliares, la cuantificación de aminas biógenas, entre otros, son algunos ejemplos de los parámetros que deben ser evaluados, para verificar la seguridad de las especies probióticas.

Por un lado, las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de los aminoácidos. Y que atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina,

feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupo aminos de la molécula, podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina). Las aminas biológicamente, tienen funciones fisiológicas esenciales en los seres vivos (ten Brink *et al.*, 1990). El problema se evidencia cuando tras la descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por ciertos microorganismos, la concentración de algunas aminas aumenta demasiado y pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos. Es el caso de la cadaverina y la putrescina, que son las aminas que medimos durante nuestro ensayo, las cuales pueden llegar a producir rigidez mandibular, bradicardia e hipotensión.

Por otro lado, en cuanto a hidrólisis de las sales biliares se refiere, su mayor problema radica en que grandes cantidades de sales biliares desconjugadas pueden tener efectos indeseables para el huésped humano (Begley, Hill and Gahan, 2006). Es por este motivo, que surgen preocupaciones sobre la seguridad de la administración de una cepa probiótica, que sea positiva para hidrolasas de sales biliares (BSH). Sin embargo, la gran mayoría de géneros bacterianos que probablemente se usarían como probióticos, no son capaces de deshidroxilar las sales biliares desconjugadas (Gilliland and Speck, 1977; Takahashi and Morotomi 1994; Ahn *et al.*, 2003), por lo que la mayoría de los productos de descomposición de la actividad de las hidrolasas (BSH) pueden precipitarse y excretarse en las heces, dependiendo del pH colónico y del tiempo de tránsito intestinal (Thomas *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001; Veysey *et al.*, 2001).

El conjunto de expertos de la FAO y la OMS, que consideraron las directrices para la Evaluación de los Probióticos en los Alimentos, determinaron que, en algunos casos, los modelos animales existen para dar validez a los efectos y a la determinación del mecanismo de acción del probiótico *observados in vitro*. El

grupo de trabajo recomendaba que cuando fuera adecuado, era necesario el uso de estos modelos antes de los ensayos en seres humanos. Los pequeños roedores representan la mayor parte de los animales empleados como modelos animales en investigación médica, investigación biológica y las pruebas de toxicidad en países como el Reino Unido. De ellos, los ratones representan el 70% del total de los animales empleados. Son pequeños, baratos y fáciles de manejar, lo que los convierte en los candidatos ideales para los experimentos de laboratorio. Su corta vida y su rápida reproducción hacen posible investigar los procesos biológicos en muchos sujetos, en todas las fases del ciclo vital.

Sus sistemas reproductores y nerviosos son similares a los de los humanos y padecen muchas de las mismas enfermedades, como el cáncer, la diabetes e incluso la ansiedad. En nuestro caso el objetivo principal de los experimentos era determinar la patogenicidad de las cepas de *S. dentisani* 7746 y 7747 mediante el uso de un modelo murino. Se estimó entre otros, el peso de los animales al inicio y final del ensayo, y la posible traslocación de las cepas a órganos extraintestinales.

En lo que respecta a los probióticos intestinales y para asegurar la funcionalidad de los microorganismos en el tracto digestivo, es necesario que sobrevivan a las enzimas (principales responsables del proceso de digestión y cuya función es romper los enlaces entre los componentes de los alimentos), al medio ácido del estómago, resistir la bilis presente en el intestino delgado y lograr la colonización del nicho intestinal. Sin embargo, para la cepa analizada nuestro objetivo era diferente, ya que el campo de acción de la cepa de *S. dentisani*, no es a nivel digestivo sino bucal. Por ello, nos interesaba determinar el comportamiento de las cepas de *S. dentisani* al paso por el tracto gastrointestinal, identificando principalmente su capacidad de sobrevivir o no a las condiciones gástricas, tras ejercer el efecto funcional en la boca.

Al ser un ensayo preliminar, necesitábamos encontrar la mejor forma de simular las condiciones fisiológicas de tracto gastrointestinal en humanos, bajo condiciones normales. Para ello y tras evaluar varias opciones para este ensayo, nos decidimos por utilizar el Digestor Dinámico *in vitro* (Figura 4.2) de la empresa AINIA.



**Figura 4.2.** Imagen del Digestor Dinámico *in vitro*. AINIA Centro Tecnológico

El principal objetivo del digestor es reproducir lo más fielmente posible el proceso de digestión estomacal e intestinal. En el estómago se lleva a cabo la digestión gástrica de los alimentos, consistente en la transformación del bolo alimenticio en una masa fluida llamada quimo.

Un factor fundamental en el proceso es el movimiento peristáltico que se produce tanto en el estómago como en el intestino. Con este fin, es necesario lograr un mezclado y amasado del contenido interno de digestión, mediante un fluido cuyo bombeo incrementa la presión sobre las paredes del sistema de

reacción. Para lograr una velocidad de movimientos peristálticos adecuada al proceso de digestión real, existe también un sistema de bombeo de extracción del fluido de la cámara. El control del tránsito digestivo es regulado mediante el cierre o apertura de válvulas peristálticas que conectan los diferentes compartimentos del equipo.

En las cámaras de digestión, tanto en la sección estomacal como en la sección intestinal, se generan reacciones que modifican el pH, de manera que es necesario un lazo de control en cada cámara que asegure el pH en torno a un punto consigna. En el estómago, el proceso natural incorpora ácido al medio de digestión, mientras que, en la sección intestinal, el pH se neutraliza con una base. Las secreciones fisiológicas son introducidas en el estómago y duodeno utilizando el mismo sistema automatizado mencionado con el pH.

Por otro lado, el equipo cuenta con un sistema de control de la temperatura, para asegurar las reacciones de digestión a una temperatura corporal, independiente de las reacciones que se produzcan en el medio de reacción. La ventaja de utilizar este tipo de ensayo se basa principalmente en la rapidez de ejecución de los experimentos y el control de las variables experimentales.

En resumen, las características principales simuladas en este equipo son las siguientes:

- Temperatura 37°
- Reproducción de movimientos peristálticos
- Simulación de pH gastrointestinal
- Simulación del tiempo de tránsito gastrointestinal
- Monitorización de jugos gástricos e intestinales

En cuanto al proceso de escalado, este significa un cambio en la escala de volumen del proceso de crecimiento bacteriano, que pueda permitir su producción en masa para su comercialización.

El escalamiento, puede verse perturbado por las condiciones que afectan el crecimiento de los microorganismos y la formación de productos en un proceso bioquímico (temperatura, presión, pH, velocidad de agitación y concentración de nutrientes). Las variables más críticas son la temperatura y la concentración de oxígeno porque al incrementar el volumen se hace más difícil la transferencia de calor y la transferencia de masa, siendo necesarios sistemas más eficientes de calentamiento, agitación y aireación. La optimización de la producción de *S. dentisani* se basaría en el mejoramiento de las condiciones ambientales del cultivo como la temperatura, pH, agitación, aireación y concentración de nutrientes, ajustando así las condiciones óptimas para el crecimiento de las cepas, con la mayor obtención de biomasa y a menor coste. Ello garantizaría la reproducibilidad del proceso productivo a escala industrial, de forma tal que cumpliendo las especificaciones, se optimiza la producción y se obtiene la biomasa final viable, para ser usada como un posible probiótico.

Así mismo, es muy importante evaluar la supervivencia de las cepas durante el proceso de liofilización y determinar la viabilidad de los probióticos, durante el almacenamiento de sus formas de dosificación (en nuestro caso los liófilos obtenidos). La finalidad principal de este estudio sería identificar la sustancia que permitiera una mejor viabilidad celular, tras someter las células bacterianas de *S. dentisani* a procesos de congelación y liofilización. La liofilización es una técnica comúnmente utilizada, para la producción de probióticos en formato seco. En este proceso, los probióticos están expuestos a daños por las condiciones del proceso, como temperaturas de congelación muy bajas y deshidratación (Jalali *et al.*, 2012).

Las células se congelan primero por debajo de la temperatura crítica de la formulación y luego se secan por sublimación, mediante alto vacío en dos fases:

un secado primario inicial, durante el cual se elimina el agua no unida y después un secado secundario, mediante el cual se elimina el agua unida a las células bacterianas (Otejen and Haseley, 1999; Jennings, 1999). Estas etapas pueden dañar los constituyentes de la pared celular y conducir a la muerte celular. Sin embargo, la presencia de crioprotectores en el medio de secado, aumenta la viabilidad de las células tras el secado (Hubálek, 2003).

Una multitud de factores afecta la efectividad de la criopreservación de microorganismos, por ejemplo, la especie bacteriana, su tamaño y forma de la célula, fase y tasa de crecimiento, temperatura de incubación, composición del medio de crecimiento, pH, osmolaridad y aireación, contenido de agua celular, contenido de lípidos y composición de las células, densidad al congelar, composición del medio de congelación, velocidad de enfriamiento, temperatura de almacenamiento y duración del almacenamiento, tasa de calentamiento y medio de recuperación, entre otras (McLellan and Day, 1995).

Es importante optimizar el proceso de producción de preparaciones probióticas, para obtener un producto con propiedades adecuadas y un mayor número de microorganismos probióticos viables.

Así pues, en el siguiente capítulo, se recogen todos los ensayos realizados y resultados obtenidos, que nos permiten demostrar la seguridad e inocuidad de la cepa de *S. dentisani*, además de establecer las condiciones específicas que favorezcan la producción de la cepa y sus sustancias inhibitorias, para poder ser producido a gran escala y comercializado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 pH y temperatura óptimos de crecimiento

Con el fin de evaluar el pH óptimo para el crecimiento en las cepas de *Streptococcus dentisani* sp.nov, se realizó inicialmente un cultivo en agar ICC (Condalab®) en aerobiosis a 37°C overnight. Al día siguiente, se prepararon los inóculos usando 5 ml de caldo ICC (Condalab®). Cada ensayo se realizó por duplicado y los pH testados fueron 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5. Dado que el caldo ICC tras su preparación tiene un pH de 7,0, se empleó ácido ortofosfórico y fosfato disódico para modificar el pH inicial. Los inóculos se realizaron a una densidad óptica final de 0.050 y se incubaron a 37°C en aerobiosis, realizando lecturas en el fotómetro BioPhotometer plus (Eppendorf) a 600 nm a las 4, 6, 8 y 10 horas después de inocular el medio. Se promediaron los resultados de las densidades ópticas obtenidas y se graficaron.

La determinación de la temperatura de crecimiento óptima para las cepas 7746 y 7747 se determinó a partir de cultivos “overnight” de las mencionadas cepas en agar infusión cerebro corazón (ICC Condalab®) a 37°C en aerobiosis. Se realizaron ensayos por duplicado para cada temperatura, preparando un inóculo usando 5 ml de caldo infusión cerebro corazón (ICC Condalab®) y resuspendiendo tantas colonias de las cepas como fuera necesario, para alcanzar una densidad óptica de 0.050, los ensayos de temperatura se realizaron a 28°C, 31°C, 34°C, 37°C, 40°C, 43°C y 46°C en atmósfera de aerobiosis. Las lecturas de la densidad óptica a 600 nm se realizaron a las 6, 8, 10 y 12 horas después de la

inoculación del medio. Se promediaron los resultados de las densidades ópticas obtenidas y se graficaron.

## 2.2 Medio de cultivo para mejorar el crecimiento de la cepa y la inhibición de *S. mutans*

Para determinar el medio de cultivo óptimo, que mejorara el crecimiento de las cepas de *Streptococcus dentisani* y obtener una cantidad mayor de biomasa, se testaron los siguientes medios de cultivos líquidos bacterianos, caldo infusión cerebro corazón (ICC Condalab®), caldo infusión cerebro corazón suplementado con dextrosa al 1%, caldo soja tripticaseína (TSB Condalab®), caldo soja tripticaseína enriquecido con 0.1% de extracto de levadura y caldo Mueller Hinton. Así mismo, se planteó la posibilidad de utilizar el medio lactosuero suplementado con 1% de dextrosa. Pero puesto que no puede ser esterilizado en autoclave ya que pierde sus propiedades físico-químicas, ni puede ser filtrado, la preparación de este medio se realizó en cámara de bioseguridad y se usó inmediatamente.

Durante los ensayos, se emplearon cultivos bacterianos bien diferenciados de las cepas 7746 y 7747 y a partir de ellos, se realizaron 2 inóculos para cada cepa en 10 ml de caldo ICC. Se incubó a 37°C en aerobiosis por 24 horas. Cada medio de cultivo se ensayó por duplicado, para lo cual se usaron 50 ml de cada uno de los medios de cultivo en tubos tipo Falcon y realizando inóculos de las cepas a una densidad óptica final de 0.05 incubando a 37°C en atmósfera de aerobiosis. Pasadas 18 horas después de la inoculación, se realizaron lecturas de densidad óptica seriadas para identificar el momento en que las cepas llegaban a fase estacionaria en cada medio de cultivo. Al alcanzar la fase estacionaria, se detuvo la incubación y se centrifugaron los tubos a 2.500 rpm a 4°C en 2 tandas de 40 minutos cada una. El sobrenadante se pasó a un tubo tipo Falcon nuevo y el

sedimento se incubó nuevamente a 37°C por 12 horas para obtener el porcentaje de masa celular bacteriana final.

Los sobrenadantes se filtraron por membranas de 0,2  $\mu\text{m}$  (Pall Life Sciences®) y posteriormente se filtraron mediante tubos (Amicon®) de 3.000 y 10.000 daltons, recuperando las fracciones de entre 10-3 kDa y >10kDa respectivamente, centrifugando a 4°C durante 40 minutos y 2.500 rpm. La fracción menor a 3kDa se concentró en el evaporador rotativo digital RV 10 (IKA®), y para cada medio de cultivo empleado se concentró un volumen de 50 ml para ser usado como control.

Para los ensayos de inhibición, se cultivó *Streptococcus mutans* UA159 en medio sólido (agar ICC) durante 24 horas a 37°C y a partir de este cultivo, se preparó un inóculo en 3 ml de ICC con una densidad óptica de 0.050, manteniéndolo en fase exponencial tras diluciones seriadas y realizando un inóculo final en medio ICC a una D.O final de 0.050 a 600 nm. En una placa de 96 pocillos (Nunc®) se ensayó cada sobrenadante por triplicado, añadiendo 30  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes obtenidos y 170  $\mu\text{l}$  del cultivo de *S. mutans*. La placa se incubó en el equipo Infinite® F200 PRO (TECAN) a 37°C, con períodos de lectura cada 30 minutos. Antes de cada medida de densidad óptica a 600 nm, se realizaba una agitación orbital a 37 rpm durante 20 segundos.

### 2.3 Condiciones óptimas para mejorar la inhibición frente a especies cariogénicas

El objetivo de este ensayo era obtener sobrenadantes en fase exponencial y fase estacionaria de las cepas 7746 y 7747 y *S. mutans* en fase estacionaria. Para ello, a partir de colonias bien diferenciadas de las cepas se realizaron inóculos en 10 ml de caldo infusión cerebro corazón (ICC Condalab®), se incubaron a 37°C en atmósfera de aerobiosis entre 24-48 horas hasta alcanzar fase estacionaria. Se

realizaron a la vez cultivos similares, pero la incubación se detuvo cuando las cepas de *S. dentisani sp.nov* alcanzaron una densidad óptica de 0.30 a 600 nm, para obtener un cultivo en fase exponencial.

Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 2000 rpm durante 25 minutos a 4°C y los sobrenadantes obtenidos se filtraron por membranas de 0,2 µm y luego se filtraron en tubos *Amicon*® de 3.000 y 10.000 daltons centrifugando a 4°C durante 40 minutos a 3000 rpm. La fracción de interés era la de 3kDa, que se concentró en el evaporador rotativo digital RV 10 (*IKA*®), 30 minutos a 45°C y 50 mbar de presión. La fracción obtenida fue filtrada nuevamente por membrana de 0,2 µm, y se concentraron 10 ml de medio ICC para usarlo como control en los ensayos en placa multipocillo.

La fracción de sobrenadante de <3kDa fue usada para el ensayo de inhibición, se partió de un inóculo de *S.mutans* en 3 ml de ICC con una densidad óptica inicial de 0.050 que se mantuvo en fase logarítmica por medio de diluciones continuas. Una vez listo el cultivo de *S.mutans* se preparó una dilución en medio ICC a una densidad óptica final de 0.050 medida a 600 nm. Una vez realizado el diseño del plato, en una placa multipocillo (*Nunclon*®) de 96 pocillos se añadieron 30 µl de los sobrenadantes obtenidos en fase exponencial y estacionaria y 170 µl del cultivo de *S.mutans*, ensayando cada sobrenadante por triplicado, en el equipo *Infinite*® F200 PRO (*TECAN*) a unas condiciones de cultivo de 37°C, con períodos de lectura cada 30 minutos. Antes de cada medida de densidad óptica a 600 nm, se realizaba una agitación orbital a 37 rpm durante 20 segundos.

## 2.4 Crecimiento en leche

Para identificar el crecimiento de las cepas 7746 y 7747 en leche, se realizó primero un cultivo “overnight” a 37°C en agar ICC en atmosfera de aerobiosis a

partir de colonias bien identificadas. Con las colonias obtenidas se prepararon inóculos a una densidad óptica final de 0.050 en 5ml de leche semidescremada (Pascual®), empleando caldo ICC como patrón para identificar el volumen necesario para llegar a la densidad óptica deseada. Las mediciones se hicieron a las 2, 6, 8, 10, 12, 24, 26, 28, 30, 32, 34 y 36 horas después de realizar el inóculo. Para evitar los cambios drásticos de temperatura y condiciones al realizar cada lectura, se decidió realizar tantos inóculos como mediciones se llevaran a cabo, es decir 12 inóculos iniciales.

Las lecturas incluían la medición directa del pH alcanzado y a partir de 1 ml de cultivo se realizaron diluciones seriadas para calcular el recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs) sembrando 100 ul de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , y  $10^{-6}$ , por duplicado mediante extensión en superficie en agar ICC, incubando las placas a 37°C por 48 horas. Para el recuento de UFCs se seleccionaron las placas que tenían entre 25 y 250 colonias y se promediaron los resultados de las dos placas usadas para cada dilución. Los resultados finales fueron obtenidos multiplicando el número de colonias obtenidas por el factor de dilución de la placa, multiplicando esta cifra por 10 para expresar el recuento de UFC por mililitro de muestra.

## 2.5 Resistencia a antibióticos: Identificación *in silico* y en experimentos de dilución

### 2.5.1 *In silico*

Para identificar los posibles genes de resistencia se usó la base de datos de genes de resistencia a antibióticos (ARDB) que contiene más de 375 tipos de genes de resistencia (Bennedsen *et al.*, 2011). Las secuencias fueron descargadas en un archivo excel e importadas al Genomic Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark) convirtiéndolas en un genoma artificial de factores de virulencia, y

usando los genes de la subunidad beta de la RNA polimerasa como controles positivos. El ensamble de las secuencias se realizó usando Genomic Workbench 3 y se comparó el genoma *in silico* de genes de resistencia a antibióticos *vs* el genoma de las cepas 7746, 7747, *Streptococcus salivarius* CCHSS3 y *Lactobacillus casei* ATCC 334.

### 2.5.2 En experimentos de dilución

Para cada antibiótico se realizaron ensayos por duplicado, y se prepararon soluciones de trabajo a partir de soluciones stock de los antibióticos (amoxicilina, ampicilina, cefotaxime, claritromicina, clindamicina, cloxacilina, daptomicina, eritromicina, estreptomina, gentamicina, imipenem, kanamicina, levofloxacin, linezolid, piperacilina, rifampicina, tetraciclina y vancomicina). Cada solución de trabajo estaba compuesta por una cantidad de caldo soja y tripticaseína (TSB Condalab®) que permitiera obtener una concentración final de 32 mg/L para cada antibiótico, excepto para la estreptomina y la kanamicina donde se usó una concentración inicial de 256 mg/L y 1561,6 mg/L respectivamente.

En una placa multipocillo (Nunclon®) de 96 posiciones se prepararon concentraciones seriadas de cada antibiótico en caldo soja tripticaseína. El último pocillo se usó como control sin antibiótico. Cabe anotar, que para el ensayo de daptomicina, se adicionaron 0,01mg/ µl de cloruro cálcico a cada pocillo, ya que este antibiótico tiene un mecanismo de acción dependiente de iones calcio.

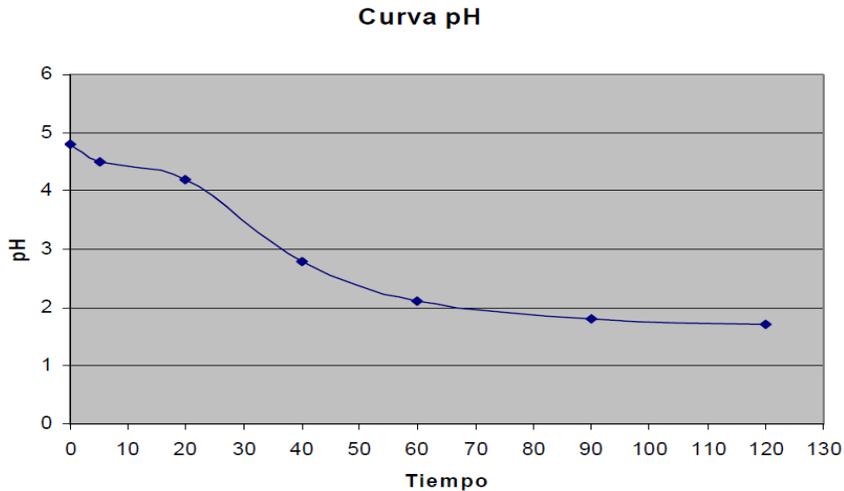
A partir de colonias bien diferenciadas de las cepas 7746 y 7747 se realizó una nueva siembra en agar ICC, incubando a 37° en aerobiosis. El inóculo se realizó tomando con asa desechable varias colonias del cultivo anterior y resuspendiéndolas en 10 ml de caldo TSB hasta alcanzar una densidad óptica de

0.050, y de esta suspensión se añadieron 100 µl a cada pocillo, incubando la placa en el equipo Infinite® F200 PRO (TECAN) a 37°C, con lecturas seriadas cada 30 minutos a 600nm. Como control de calidad del proceso se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* CECT 240.

## 2.6 Resistencia al proceso digestivo - Ensayo de digestión

Se realizaron 2 ensayos de resistencia gástrica para cada una de las cepas de *S. dentisani* (7746-7747) y un ensayo control (un total de 5 ensayos). El protocolo de digestión utilizado fue el descrito en (Khalf *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011), con una duración total de procesamiento de 2 horas, a una temperatura constante de 37°C. El proceso de digestión se mantuvo bajo condiciones de anaerobiosis, mediante la inyección regular de N<sub>2</sub>. Se extremaron las medidas de asepsia para que no hubiera ningún tipo de contaminación durante el proceso.

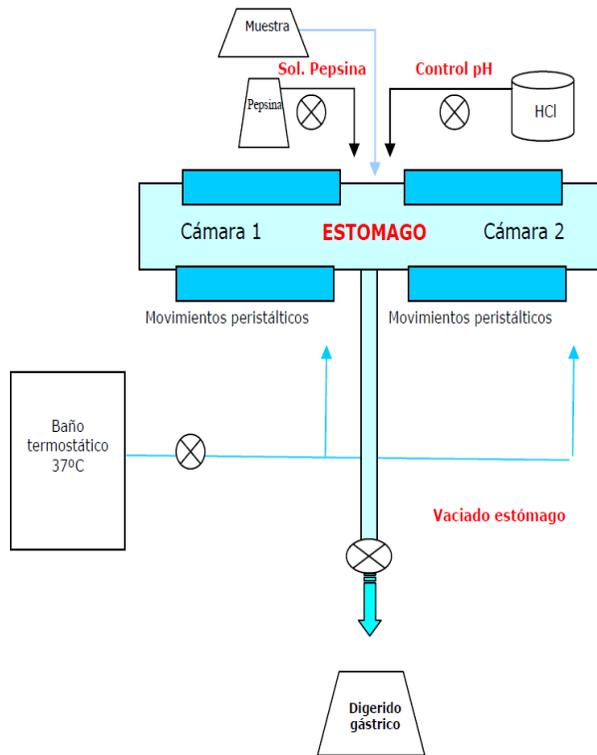
Con el fin de simular la masticación, se pesó en una bolsa estéril el probiótico objeto de estudio, se adicionó una solución acuosa de alfa amilasa (Meunier *et al.*, 2008; Madureira *et al.*, 2011) y una solución de electrolitos gástricos, completando hasta 300 ml con agua destilada. Finalmente se homogeneizó la muestra en un stomacher. Se introdujo la solución residual inicial estomacal y se programó una rampa de pH en el modelo de estómago, para que el protocolo simulara las condiciones de pH características de un adulto sano (pH 2) (Minekus *et al.*, 1995), tal y como se muestra en la Figura 4.3.



**Figura 4.3.** Curva de pH obtenida en el estómago *in vitro*

Además, se introdujo una solución gástrica con pepsina en el estómago. La mezcla del quimo se llevó a cabo mediante la compresión y relajación de las cámaras flexibles y los movimientos peristálticos fueron controlados mediante un ordenador.

El vaciado del estómago se llevó a cabo de forma gradual. Durante cada ciclo peristáltico un volumen de quimo fue transferido al duodeno. El tránsito gastrointestinal fue rápido ( $t_{1/2}$ : 35 minutos) teniendo en cuenta bibliografía descrita (Minekus *et al.*, 1995; Khalf *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011). De igual forma, estos parámetros se basan en datos *in vivo* del tránsito gástrico de la leche (Marteau *et al.*, 1990). El digerido gástrico se recogió en un matraz Erlenmeyer sumergido en un baño de hielo, con el fin de paralizar la actividad enzimática. La Figura 4.4 esquematiza el protocolo de digestión gástrica empleado.



**Figura 4.4.** Esquema del protocolo de digestión gastrointestinal.

Se llevó a cabo una toma de muestras que permitiera evaluar la resistencia a la masticación y a la digestión gástrica. Para ello, se tomaron 3 ml en los siguientes procesos:

- Muestra de referencia.
- Muestra tras el proceso de masticación.
- Proceso de Digestión gástrica: a los 30, 60 y 120 minutos.

El cultivo para el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se realizó en las 2 horas siguientes a la toma de la muestra, para no perder viabilidad celular bacteriana.

### 2.6.1 Preparación de inóculos

Los inóculos para el ensayo de resistencia se realizaron a partir de liófilos de las cepas de *Streptococcus dentisani*. Estos liófilos, fueron producidos en la Colección Española de Cultivos Tipo CECT, a partir de las cepas depositadas allí CECT 8312T y CECT 8313, correspondientes a *S. dentisani* 7746 y *S. dentisani* 7747 respectivamente. Para cada cepa, se tomó una colonia pura de la placa crecida de ICC agar y se realizó su resiembra e incubación en 10 ml de medio líquido ICC a  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (suspensión microbiana de trabajo). Tras este tiempo, se realiza el recuento de cada una de las cepas en la suspensión de trabajo, mediante la dilución, siembra en medio ICC agar y recuento de UFC, con el objetivo de conocer la proporción de *S.dentisani* previa al ensayo de resistencia (nivel de referencia).

### 2.6.2 Recuentos microbiológicos

El recuento de *S. dentisani* en cada una de las etapas de digestión fue realizado mediante diluciones seriadas y siembra en medio ICC agar. Las placas fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 horas. Tras este tiempo, se procedió a realizar la lectura y recuento de las colonias presentes en el medio de crecimiento. Las placas de recuento son conservadas en refrigeración, para la confirmación de las colonias presentes mediante PCR cuantitativa.

## 2.7 Capacidad de producción de metabolitos no deseados

### 2.7.1 Cuantificación de la producción de ácido láctico

Para la determinación de los dos isómeros del ácido láctico (D/L), presentes o no en el sobrenadante de cultivo de las cepas *S.dentisani* 7746 y 7747, se utilizó el Kit comercial D-/L-Lactic Acid de Megazyme. La determinación consistió en analizar por espectrofotometría el producto generado por la acción específica de

las enzimas (D-Lactato deshidrogenasa y L-Lactato deshidrogenasa), sobre el isómero correspondiente del ácido láctico. Para el análisis, se obtuvieron sobrenadantes de las dos cepas, a partir de cultivos obtenidos tras 20 horas de crecimiento en caldo ICC con dextrosa al 1%, incubados a 37°C.

### 2.7.2 Cuantificación de la producción de aminas biógenas

La identificación de la producción de aminas biógena, se llevó a cabo mediante un análisis cuantitativo utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acoplada a un detector de fotodiodos según lo descrito por Eerola *et al.*, 1993. Para ello, se crecieron las cepas *Streptococcus dentisani* 7746 y 7747 en medio ICC adicionado con dextrosa al 1% durante 20 h y se recogió el sobrenadante mediante centrifugación. Previamente a la detección cromatográfica, se utilizó una solución de cloruro de benzoilo para la derivatización de las aminas biógenas presentes en la muestra.

Las aminas biógenas determinadas fueron; cadaverina, histamina, putrescina y tiramina. En la Tabla 4.1, se recogen las condiciones cromatográficas para la detección de aminas biógenas.

**Tabla 4.1.** Condiciones cromatográficas para la detección de aminas biógenas

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
-	1.60	60	40
5	1.80	50	50
10	2	40	60
15	2	30	70
16	2	0	100
19	2	0	100
21	1.60	60	40
25	1.60	60	40

La cuantificación de estas aminas se llevó a cabo mediante interpolación del área obtenida para cada una de las aminas biógenas, frente a una curva patrón correspondiente previamente elaborada. Para ello, se utilizó el equipo HPLC Waters 269, con detector Waters 2996 Photodiode Array y una columna Sunfire Waters de C18 (4.6\*150mm) en la empresa Biopolis SA (Valencia). Los eluyentes fueron agua Milli Q (Solución A) y Acetonitrilo (Solución B) con un flujo constante de 1ml/min. El análisis se realizó a una longitud de onda 254 nm.

### 2.7.3 Análisis de hidrólisis de sales biliares

La hidrólisis de las sales biliares liberando aminoácidos libres y colesterol, se debe a la acción de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH). El ensayo de actividad de la enzima BSH, se llevó a cabo sobre dos sustratos diferentes, dos sales biliares cuyos aminoácidos que las forman son la glicina y la taurina. Estos aminoácidos reaccionan con una solución de ninhidrina, dando lugar a un compuesto coloreado que se determina espectrofotométricamente a 570 nm (Kumar *et al.*, 2006). Previamente se llevó a cabo una curva patrón, tanto para la glicina como para la taurina.

El estudio de hidrólisis de sales biliares se llevó a cabo a partir del sobrenadante obtenido en el crecimiento de las cepas durante 20 h, y directamente sobre las células de estas cepas, lisadas por fricción mediante procedimientos mecánicos.

## **2.8 Escalado del proceso fermentativo y obtención de biomasa**

Nuestros resultados preliminares sirvieron de referencia para las pruebas piloto de fermentación, subcontratadas a la empresa Proteos Biotech. Los objetivos principales fueron escalar el proceso fermentativo de las cepas de *S. dentisani* y obtener la cantidad mínima esencial de biomasa, para que el proceso industrial

de la cepa sea económicamente viable. Inicialmente se realizó una optimización de los parámetros y condiciones de crecimiento a pequeña escala para ambas cepas. Para ello, se empleó como medio de cultivo, el caldo soja tripticaseína (TSB), un medio de crecimiento altamente nutritivo. Ambas cepas se crecieron en matraces de 500 ml para optimizar los parámetros y condiciones de crecimiento. Para ello, se fijaron algunos parámetros como la temperatura, agitación y tiempo de crecimiento.

La optimización del crecimiento bacteriano se realizó analizando tres condiciones de estudio:

- Cultivo Control: Crecimiento bacteriano en términos de Densidad Óptica, medida a 600nm.
- Determinación de la variación de pH del medio de cultivo, durante el crecimiento bacteriano y ajuste del mismo a un valor entre 5 y 7.
- Determinación del consumo de glucosa y ajuste de glucosa del medio de cultivo a 2,5 gr/l.

En cada una de las condiciones se recogieron muestras a diferentes tiempos y se midió la densidad óptica a 600 nm, recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml a tiempo final, pH y Glucosa. Los resultados obtenidos permitían determinar, qué condiciones se debían ajustar para el correcto crecimiento bacteriano de las cepas de *S. dentisani* 7746 y 7747.

Una vez determinados los parámetros de crecimiento bacteriano y las condiciones de cultivo (con ajuste de pH y concentración de glucosa del medio) se realizó un escalado en un fermentador de 100 litros, buscando alcanzar niveles de biomasa en UFC entre  $10E^{12}$ - $10E^{13}$ , controlando la temperatura, oxigenación, pH y tiempo de crecimiento bacteriano, para así determinar los parámetros adecuados para un crecimiento bacteriano óptimo y la obtención de una mayor cantidad de biomasa celular.

## 2.9 Resistencia de las cepas de *S. dentisani* al proceso de congelación y liofilización

Tras el proceso de fermentación a gran escala, en fermentadores de 100 litros, se dividió en tres porciones la biomasa celular resultante y se ensayaron como crioprotectores, la maltodextrina al 5% y el inositol al 5%. Además, se empleó como control, una suspensión de biomasa celular resuspendida en PBS 1X. Se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFCs) en la biomasa celular tras la fermentación y, por otra parte, se analizó la viabilidad celular con los crioprotectores, tras el proceso de liofilización. Los líofilos de cada condición se envasaron en viales de vidrio transparente tipo I.

## 2.10 Ensayos de toxicidad en animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos

### 2.10.1 Cepas bacterianas, medio de cultivo y condiciones de crecimiento

Se utilizaron en el estudio las cepas *S. dentisani* 7746 y 7747. Ambas cepas se cultivaron en agar (ICC) suplementado con dextrosa (1%) y fueron incubadas a 37°C en atmósfera húmeda 5 % CO<sub>2</sub>, durante 48 horas.

### 2.10.2 Animales y diseño experimental

El ensayo se realizó con ratones macho BALB/CJ. Para abordar el estudio de la patogenicidad de las cepas, se han utilizado 6 grupos de 8 ratones BALB/CJ de 6 a 8 semanas de edad, los cuales fueron divididos en 6 grupos de 8 animales cada uno (Tabla 4.2).

De forma previa al ensayo, se mantuvieron los animales en aclimatación durante una semana. Estas pruebas fueron realizadas en las instalaciones del Instituto Pasteur en Uruguay y coordinadas por la empresa Biopolis SA (Valencia).

**Tabla 4.2.** Distribución de los grupos en estudio

Grupo	Estado	Tratamiento
A	Inmunocompetente	Control
C		CECT 7746
D		CECT 7747
E	Inmunodeprimido	Control
G		CECT 7746
H		CECT 7747

### 2.10.3 [Protocolo de Inmunosupresión](#)

En el caso de animales inmunodeprimidos, los grupos fueron tratados con ciclofosfamida (Laboratorios Filaxis) 40 mg/kg/día, como fármaco inmunosupresor. La dosis fue administrada intraperitonealmente, durante los cinco días previos al inicio de la administración del inóculo bacteriano y durante los 6 días subsiguientes. Todos los animales se pesaron al inicio del protocolo de inmunosupresión, al inicio de la administración del inóculo bacteriano y al final del ensayo.

### 2.10.4 [Preparación del inóculo y administración](#)

El inóculo de la cepas se realizó a partir de un cultivo realizado en medio ICC suplementado con dextrosa al 1%, incubándolo a 37°C durante 24 horas. Cada dosis se preparó a partir de un nuevo caldo, el cual fue procesado el mismo día de la administración. Para ello, las bacterias crecidas en el medio líquido fueron centrifugadas a 4500 x g durante 10 minutos y lavadas con PBS. El pellet celular se resuspendió en leche desnatada estéril, en el volumen necesario para administrar una dosis de 200 µl con 10<sup>9</sup> UFC totales por animal.

Para el grupo control, se pesó el producto liofilizado correspondiente al placebo y se resuspendió en leche desnatada estéril. En todos los casos, se administraron diariamente 200 µl del inóculo por animal utilizando sonda intra-gástrica, durante 6 días consecutivos (d0 a d5).

### 2.10.5 Verificación de la presencia de las cepas en heces

Se tomaron muestras de materia fecal, en los animales pertenecientes a los 6 grupos, en los días 0, 2, 3, 4, 5 del ensayo. Las muestras fueron conservadas a 20 °C y procesadas para obtención de ADN. La identificación de las cepas, se realizó mediante PCR cuantitativa y primers específicos para las cepas *S. dentisani* 7746 y 7747. Los oligonucleótidos utilizados se resumen en la Tabla 4.3. La mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la cepa 7747 se encuentran en las Tablas 4.4 y 4.5 respectivamente.

**Tabla 4.3.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de las cepas 7746 y 7747 mediante PCR a tiempo real.

Diana	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
CECT 7746	7746orf0540-F	ATGTTTCATCGGCTTGACAGGCT
	7746orf0540-R	TAAGCAAGCATAGAACCGCGCC
CECT 7747	4455.1F	GTTGACGTGAATCGGGGACTAT
	4455.1R	CGCCAAGGCTGGAAAAATCCT

**Tabla 4.4.** Mezcla de reacción utilizada para la detección de la cepa CECT 7747 mediante PCR a tiempo real.

Componente	Concentración final
SYBR® Master Mix	1x
4455.1F	100 nM
4455.1R	100 nM
Muestra	1 µl
Agua PCR (Sigma)	3,80 µl
Volumen Total	10 µl

**Tabla 4.5.** Condiciones de reacción utilizada para la detección de la cepa CECT 7747 mediante PCR a tiempo real.

Estados	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	50 °C	2 min.	1
2	95 °C	5 min.	1
3	95 °C	10 seg.	40
	62 °C	20 seg.	
	72 °C	25 seg	
4	Ciclo Tm		

#### 2.10.6 Evaluación de la translocación de las cepas a órganos extraintestinales

El día posterior a la última dosis, se les extrajo una muestra de sangre a los animales y mediante dislocación cervical fueron eutanasiados. Se extrajeron los nódulos linfáticos mesentéricos, bazo e hígado en condiciones asépticas. Los órganos fueron homogenizados en 10 ml de PBS estéril y 1 ml del homogenizado fue sembrado en agar (ICC) + Dextrosa (1%) y fueron incubadas a 37°C en atmósfera húmeda a 5 % CO<sub>2</sub>, durante 48 horas. Por otro lado, se tomaron 100 µl de las muestras de sangre y se sembraron en agar ICC con las mismas condiciones.

#### 2.10.7 Estudios histopatológicos

Se tomaron muestras de tres porciones diferentes del intestino: duodeno, yeyuno y colon y se sumergieron en solución de fijación formol buffer al 10% (formal – PBS). El procesamiento de las muestras para el estudio histopatológico, comprendía la inclusión de las muestras en parafina, cortes de 5 micras de espesor y coloración con hematoxilina y eosina para su posterior estudio patológico.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 pH y temperatura óptimos de crecimiento

En los experimentos realizados se pudo determinar que el pH óptimo de crecimiento de las cepas 7746 y 7747 se encuentra entre 6,0 y 7,5 para las dos cepas. Así mismo, se observa que a pH 7,0 se obtiene un crecimiento mejor, tras 8 horas después de la inoculación del medio. Pasadas 10 horas, el crecimiento, en términos de biomasa bacteriana, se iguala para los pH 6,0, 6,5, 7,0 y 7,5 (Figura 4.5).

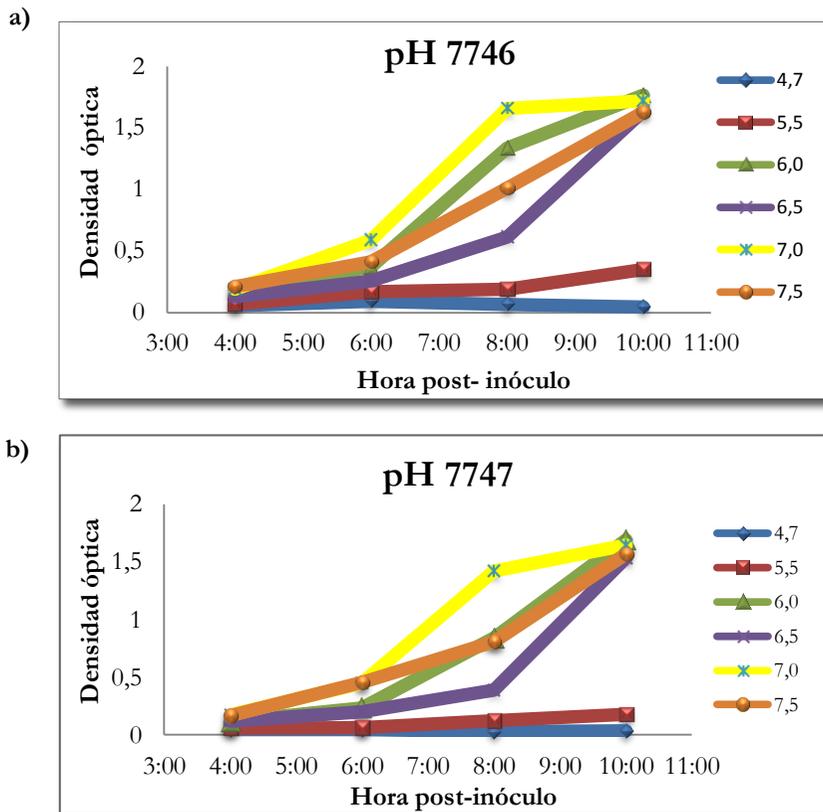


Figura 4.5. Resultados obtenidos en experimentos de determinación de pH óptimo, para la cepas a) *S. dentisani* 7746 y b) *S. dentisani* 7747.

Por otro lado, según las lecturas obtenidas durante los ensayos para evaluar la temperatura óptima para las cepas 7746 y 7747, pudimos determinar que son bacterias mesófilas, con una temperatura óptima de crecimiento entre 34°C y 40°C. Ambas cepas tuvieron picos de crecimiento a temperaturas determinadas (Figura 4.6).

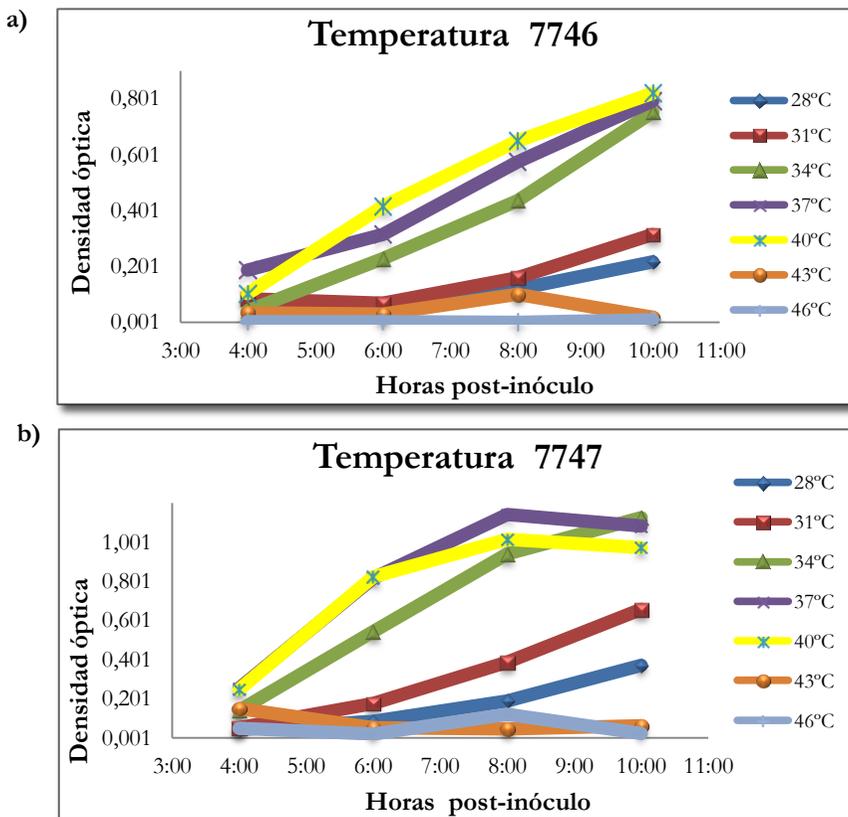


Figura 4.6. Datos observados en ensayos de temperaturas óptimas de crecimiento, para la cepas a) *S. dentisani* 7746 y b) *S. dentisani* 7747

### 3.2 Medio de cultivo para mejorar el crecimiento de la cepa y la inhibición de *S. mutans*

En cuanto al medio de cultivo para obtener una mayor cantidad de masa celular (biomasa) en gramos por litro de medio de cultivo, el medio más eficiente fue el

caldo soja y tripticaseína, suplementado con extracto de levadura TSB (Tabla 4.6). Puesto que la absorbancia del lactosuero, no podía ser medida dadas las características del medio, en este caso se designó que después de transcurridas 24 horas de inocular el medio las células llegaron a fase exponencial.

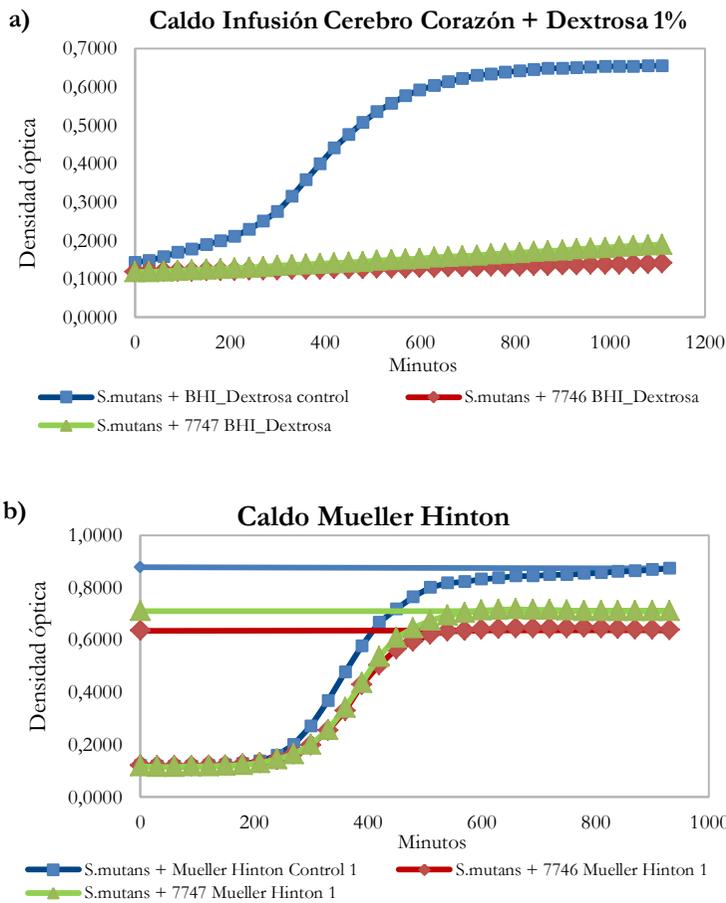
**Tabla 4.6.** Densidad óptica máxima alcanzada, con el uso de diferentes medios de cultivo para el crecimiento de *S. dentisani*. Se indica también, la producción final de masa celular (biomasa), en gramos por litro de medio de cultivo. N.A: No Aplica.

Medio de cultivo	Cepa	Densidad óptica máxima	Producción de biomasa g/L
<b>Caldo infusión cerebro corazón</b>	7746	1,489	0,625
	7747	1,427	0,662
<b>Caldo infusión cerebro corazón + Dextrosa 1%</b>	7746	1,935	0,701
	7747	1,454	0,608
<b>Caldo soja y tripticaseína</b>	7746	1,758	0,637
	7747	1,567	0,875
<b>Caldo soja y tripticaseína + Extracto de levadura</b>	7746	1,979	0,962
	7747	1,658	0,775
<b>Lactosuero + Dextrosa 1%</b>	7746	N.A	4,475
	7747	N.A	3,725
<b>Caldo Mueller Hinton</b>	7746	0,402	0,251
	7747	0,392	0,257

Por otro lado, el medio de cultivo que permitió un mayor efecto inhibitor de las cepas de *S. dentisani* sobre *S. mutans* fue el caldo infusión cerebro corazón (ICC) suplementado con dextrosa al 1% (Tabla 4.7). En medio Mueller Hinton las cepas no llegaron a fase exponencial, incluso al incubar los inóculos durante 48 horas (Tabla 4.6). Este resultado fue verificado, al repetir el ensayo preparando nuevamente medio de cultivo Mueller Hinton, pero los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores, ya que las cepas se mantuvieron en fase exponencial, sin llegar a alcanzar fase estacionaria y no lograron el efecto inhibitor sobre *S. mutans* (Figura 4.7).

**Tabla 4.7.** Inhibición producida por *Streptococcus dentisani* sp. nov. frente a *Streptococcus mutans* UA159 expresado en porcentaje para cada uno de los medios testados.

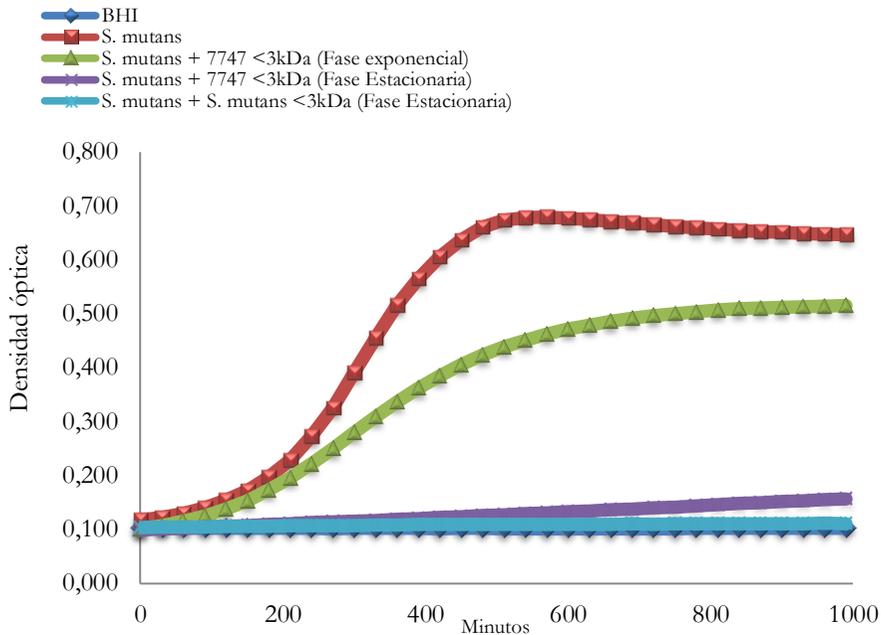
<i>Medio de cultivo</i>	% Inhibición de <i>Streptococcus mutans</i>	
	7746	7747
Caldo infusión cerebro corazón	72,1	67,1
Caldo infusión cerebro corazón + Dextrosa 1%	78,6	71,0
Caldo soja tripticaseína	62,9	62,1
Caldo soja tripticaseína + Extracto de levadura	64,0	59,7
Lactosuero + Dextrosa 1%	53,0	66,5
Caldo Mueller Hinton	27,7	19,1



**Figura 4.7.** Ensayos de inhibición utilizando los medios de cultivo  
a) Caldo ICC+Dextrosa 1% b) Caldo Mueller Hinton

### 3.3 Condiciones óptimas para mejorar la inhibición frente a especies cariogénicas

La búsqueda de las mejores condiciones de cultivo para que las cepas 7746 y 7747 produzcan la inhibición de *Streptococcus mutans* UA159 nos llevó a plantear la hipótesis de que el efecto inhibitor variara a diferentes fases del crecimiento celular de *S. dentisani*, y también dependiendo del medio de cultivo. En la Figura 4.8 podemos observar la dinámica de crecimiento bacteriano en diferentes etapas de cultivo bacteriano.



**Figura 4.8.** Ensayo de inhibición de *S. mutans* UA159, en diferentes fases de crecimiento bacteriano en este caso para la cepa 7747.

### 3.4 Crecimiento en leche

Los resultados obtenidos en las Figuras 4.9 a y b, determinan que las cepas 7746 y 7747 tienen un buen crecimiento en leche. Obteniendo un recuento de UFCs satisfactorio, además de evidenciar un descenso de pH. La fermentación de lactosa se corroboró en las pruebas de tiras API (Capítulo 1).

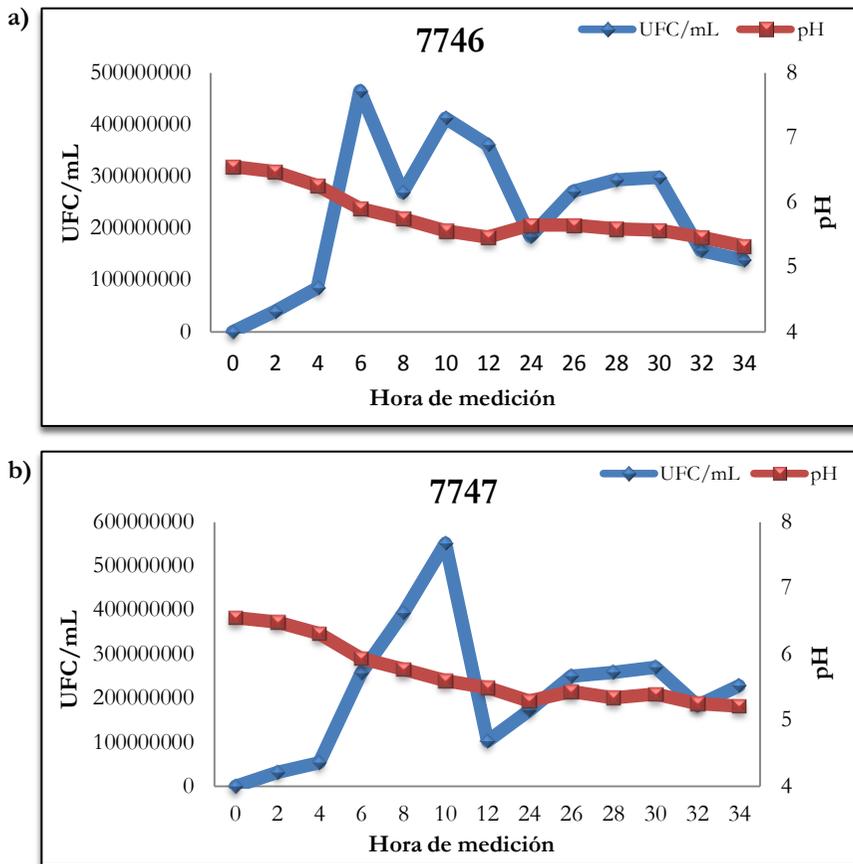


Figura 4.9. Resultados de los ensayos de crecimiento en leche para la cepas a) 7746 y b) 7747

### 3.5 Resistencia a antibióticos: Identificación *in silico* y en experimentos de dilución

#### 3.5.1 *In silico*

Para la construcción *in silico* de los genomas, se descargaron del GenBank las secuencias de los genes de resistencia a antibióticos y se importaron en el Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Dinamarca). Se trata de un software que gracias a sus múltiples herramientas permite el análisis, comparación y visualización de datos de secuenciación de última generación, generando así una base de datos que contenía 250 secuencias de genes concatenados.

Para las cepas 7746 y 7747 se asociaron 25 posibles genes de resistencia a antibióticos, mientras que las cepas patrón *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus casei* mostraron 24 y 40 genes de resistencia, respectivamente (Tablas 4.8, 4.9 y 4.10).

**Tabla 4.8.** Posibles genes de resistencia a antibióticos que comparten las cepas 7746-7747. Se indica también la especie bacteriana con mayor similitud en la secuencia de ADN.

1- ATP-binding protein
2- Bacitracin transport ATP-binding protein bcrA
3- Carbomycin resistance protein [ <i>Streptomyces thermotolerans</i> ]
4- Hypothetical protein EUBSIR_01172 [ <i>Eubacterium siracum</i> DSM 15702]
5- Hypothetical proteinPROVALCAL_02269 [ <i>Providencia alcalifaciens</i> DSM 30120]
6- Macrolide transporter ATP-binding / permease protein [ <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895]
7- Macrolide transporter ATP-binding /permease protein [ <i>Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 62:z4,z23:--</i> ]
8- Macrolide transporter ATP-binding/permease [ <i>Citrobacter sp.</i> 30_2]
9- Multidrug efflux protein NorA [ <i>Vibrio campbellii</i> AND4]
10- Multidrug resistance protein MdtG [ <i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6]
11- Penicillin-binding protein 2X [ <i>Streptococcus pneumoniae</i> ]
12- Pristinamycin resistance protein VgaB [ <i>Staphylococcus aureus</i> ]
13- Tetracycline resistance protein [ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824]
14- Tetracycline resistance protein [ <i>Clostridium sp.</i> 7_2_43FAA]
15- Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase [ <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29200]
16- VanG type Vancomycin resistance operon gene [ <i>Enterococcus faecalis</i> ]
17- VanTG type Vancomycin resistance operon gene [ <i>Enterococcus faecalis</i> ]

**Tabla 4.9.** Probables genes de resistencia a antibióticos que comparten las cepas 7746-7747 con *S.salivarius*.

1- ATP-binding protein	6-Penicillin-binding protein 2X [ <i>Streptococcus pneumoniae</i> ]
2-Carbomycin resistance protein [ <i>Streptomyces thermotolerans</i> ] M	7-Pristinamycin resistance protein VgaB [ <i>Staphylococcus aureus</i> ]
3-Macrolide transporter ATP-binding /permease protein [ <i>Salmonella enterica subsp. arizonae serovar</i> 62:z4,z23:-]	8-Tetracycline resistance protein [ <i>Clostridium sp.</i> 7_2_43FAA]
4-Macrolide transporter ATP- binding/permease [ <i>Citrobacter sp.</i> 30_2]	9-Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase [ <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29200]
5-Multidrug resistance protein MdtG [ <i>Streptococcus pneumoniae</i> Hungary19A-6]	10-VanTG type Vancomycin resistance operon gene [ <i>Enterococcus faecalis</i> ]

**Tabla 4.10** Probables genes de resistencia a antibióticos que comparten las cepas 7746 y 7747 con *Lactobacillus casei*.

1-Bacitracin transport ATP-binding protein bcrA	5-Penicillin-binding protein 2X [ <i>Streptococcus pneumoniae</i> ]
2-Hypothetical protein EUBSIR_01172 [ <i>Eubacterium siraeum</i> DSM 15702]	6-Pristinamycin resistance protein VgaB [ <i>Staphylococcus aureus</i> ]
3-Macrolide transporter ATP-binding /permease protein [ <i>Salmonella enterica subsp. arizonae serovar</i> 62:z4,z23]	7-VanTG [ <i>Enterococcus faecalis</i> ]
4-Macrolide transporter ATP- binding/permease [ <i>Citrobacter sp.</i> 30_2].	

### 3.5.2 Identificación mediante experimentos de dilución

Los resultados de las pruebas de resistencia a 18 antibióticos se muestran en la Tabla 4.11, con sus correspondientes CMI para las dos cepas probióticas testadas.

**Tabla 4.11.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida mediante ensayos de microdilución en caldo soja y tripticaseína. Todos los valores están en mg/L.

Antibiótico	<i>Cepa 7746</i>	<i>Cepa 7747</i>	<i>S. aureus CECT 240</i>
<b>Amoxicilina</b>	0,06	0,06	0,5
<b>Ampicilina</b>	0,25	0,5	0,5
<b>Cefotaxime</b>	0,25	0,125	0,5
<b>Claritromicina</b>	4	0,25	0,19
<b>Clindamicina</b>	0,5	1	64
<b>Cloxacilina</b>	0,5	0,5	0,25
<b>Daptomicina</b>	1	2	1
<b>Eritromicina</b>	1	0,5	0,5
<b>Estreptomicina</b>	32	64	64
<b>Gentamicina</b>	16	8	16
<b>Imipenem</b>	0,5	4	0,75
<b>Kanamicina</b>	390,4	195,2	128
<b>Levofloxacino</b>	1	0,5	1
<b>Linezolid</b>	0,5	1	0,75
<b>Piperacilina</b>	0,06	0,06	0,125
<b>Rifampicina</b>	0,25	0,03	0,125
<b>Tetraciclina</b>	0,5	0,5	1
<b>Vancomicina</b>	0,5	0,25	1,5

Como control positivo, las mismas pruebas y concentraciones se usaron para la cepa tipo *S. aureus* (*CECT 240*), cuyos valores de CMI están ya descritos.

Según los resultados observados en la tabla 4.11, en terminos generales, las cepas 7746 y 7747 son sensibles a varios tipos de antibióticos usados convencionalmente, algunos de ellos de amplio espectro, como la tetraciclina o la amoxicilina que es una amino penicilina; el cefotaxime que pertenece al grupo de las cefalosporinas de tercera generación; algunos beta-lactámicos como son la ampicilina, cloxacilina, imipenem o piperacilina; la claritromicina que es un macrólido; antibióticos de tipo glucopéptido, como la daptomicina o la vancomicina; y antibióticos sintéticos o semisintéticos como el linezolid o la rifampicina, respectivamente.

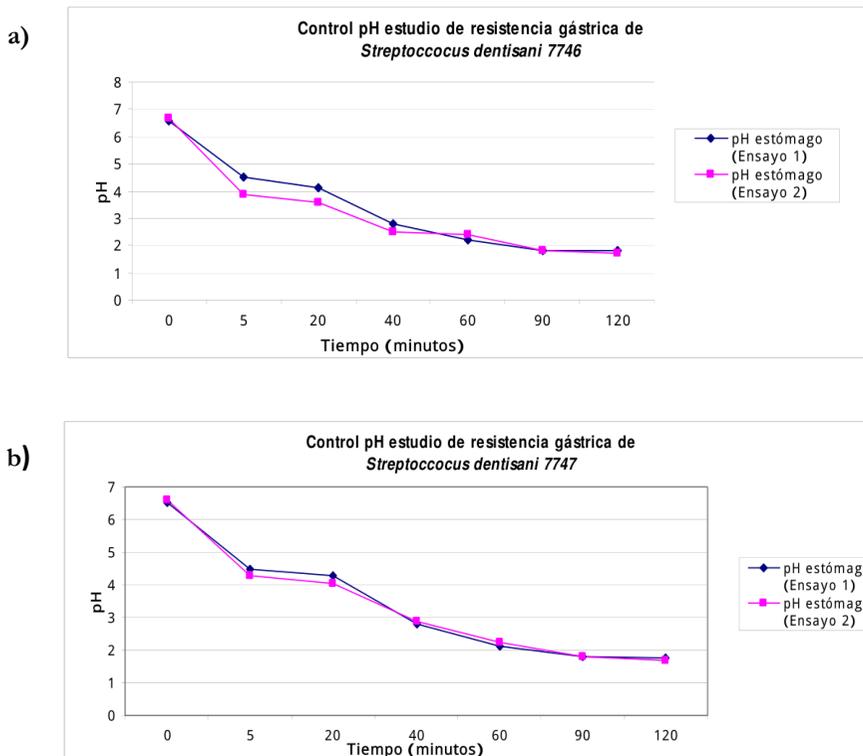
Por el contrario, las cepas muestran cierto grado de resistencia a antibióticos como la gentamicina, estreptomicina y kanamicina, los cuales forman parte del

grupo de los aminoglucósidos que son bactericidas, pero su mecanismo de acción depende de su capacidad de unión a los ribosomas bacterianos, específicamente en la subunidad 30S (Davis Bernard D, 1987) (Vakulenko and Mobashery,2003).

### 3.6 Resistencia al proceso digestivo - Ensayo de digestión

#### 3.6.1 Control de pH en el estómago e intestino

En la Figura 4.10 a y b, se observan las curvas de pH obtenidas en el estómago artificial, en los dos ensayos para las cepas de *Streptococcus dentisani* 7746 y 7747. Tal y como se observa en las Figuras, los valores de pHs del estómago corresponden con las especificaciones indicadas en el diseño del estudio de resistencia gástrica.



**Figura 4.10.** Medidas de pH en el estómago *in vitro*, durante el estudio de resistencia gástrica para la cepas a) 7746 y b) 7747 respectivamente.

### 3.6.2 Recuento microbiano en un blanco de digestión gástrica

Dada la naturaleza no selectiva del medio de cultivo de crecimiento ICC agar, para el recuento de la viabilidad de las cepas de *S.dentisani* fue necesaria la realización de un ensayo preliminar de digestión gástrica sin adicionar las cepas de interés (blanco de digestión gástrica).

A pesar de que el proceso de digestión se ha llevado a cabo en condiciones asépticas, este blanco ha sido realizado con el objetivo de conocer si microorganismos potencialmente aportados por alguno de los reactivos del ensayo, podrían crecer en las placas de recuento y contribuir a la interferencia del crecimiento o suponer el recuento inespecífico de las cepas de *S.dentisani*. Para ello, se ha llevado a cabo el proceso completo de masticación seguido de la digestión gástrica. En dicho ensayo no se han incorporado, las cepas de *Streptococcus dentisani* y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.12.

**Tabla 4.12.** Recuento microbiológico del blanco (sin *Streptococcus dentisani*), expresados en UFC/ml.

	<b>Recuento (ufc/ml)</b>	<b>pH</b>
Masticación	<1	6.9
Digestión gástrica 30 minutos	8	3.0
Digestión gástrica 60 minutos	11	2.1
Digestión gástrica 120 minutos	16	1.7

Tal como puede observarse en los resultados obtenidos, son detectados bajos niveles de microorganismos “potencialmente interfirientes” en las placas de recuento, procedentes posiblemente de la aportación de algún componente no estéril del proceso de digestión (alfa-amilasa, pepsina, HCl). Estos microorganismos presentan un crecimiento en el medio ICC agar, notablemente diferente del crecimiento de *Streptococcus dentisani*, presentando una única

morfología de colonia grande (0.5-0.8cm de diámetro), mucosa y de borde irregular, correspondiente al género *Bacillus*.

Tanto los bajos niveles detectados en las etapas del ensayo blanco, como la facilidad de distinguir (morfológicamente y microscópicamente) los microorganismos inherentes del proceso de las propias cepas de interés, permiten el recuento específico e inequívoco de las cepas de *Streptococcus dentisani* en el agar ICC.

### 3.6.3 Resultados de resistencia tras el proceso de digestión gástrica

Para evaluar la resistencia de *S.dentisani* a su paso por la boca y el estómago, se han llevado a cabo los ensayos de las dos cepas de interés, simulando las condiciones gástricas. Estos ensayos se han realizado por duplicado y en las siguientes Figuras se muestra la viabilidad de las dos cepas tras el proceso.

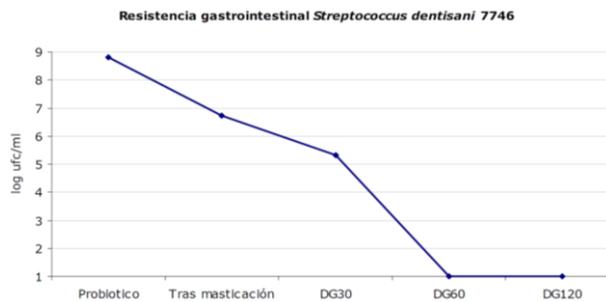


Figura 4.11. Resistencia gástrica de *Streptococcus dentisani* 7746, expresada en log ufc/ml.

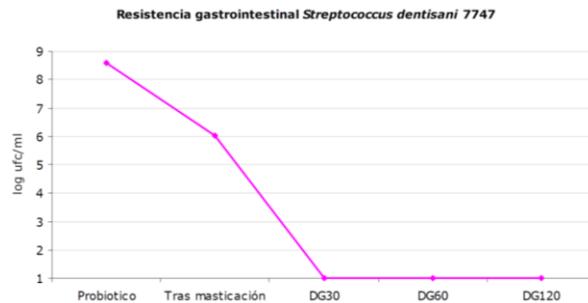


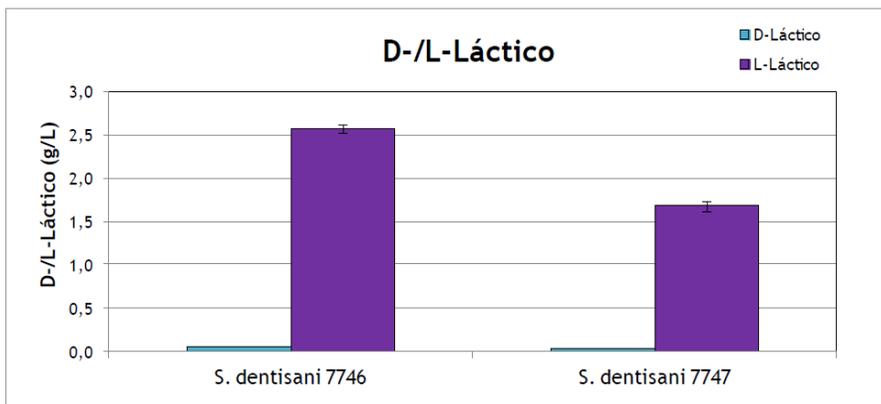
Figura 4.12. Resistencia gástrica de *Streptococcus dentisani* 7747, expresada en log ufc/ml.

Tal y como se observa en los resultados obtenidos (Figuras 4.11 y 4.12), con valores de referencia de  $10^8$  UFC/ml de *S. dentisani* 7746 y 7747 la concentración de los microorganismo disminuye en 2 ciclos logarítmicos tras el proceso de masticación y llega a reducirse hasta niveles no detectables tras el proceso de digestión gástrica, en ambos casos.

### 3.7 Capacidad de producción de metabolitos no deseados

#### 3.7.1 Cuantificación de la producción de ácido láctico

Los resultados obtenidos para la cuantificación de los dos isómeros del ácido láctico (D/L) presentes en el sobrenadante de cultivo de cada cepa, se observan en la Figura 4.13.



**Figura 4.13.** Cuantificación de D-/L-Láctico para las cepas de *S.dentisani* 7746 y 7747

Como se puede observar, la producción del isómero D-láctico fue muy baja por parte de ambas cepas. En cuanto al isómero L-láctico, el valor obtenido con la cepa *S. dentisani* 7746 es casi el doble del obtenido con la cepa *S. dentisani* 7747.

#### 3.7.2 Cuantificación de la producción de aminas biógenas

Los resultados obtenidos para la cuantificación de aminas biógenas, se encuentran resumidos en la Tabla 4.13.

**Tabla 4.13.** Cuantificación de aminas biógenas a partir del sobrenadante de cultivo.

Cepa	Aminas biógenas ( $\mu\text{g/ml}$ de sobrenadante)			
	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina
<i>S. dentisani</i> 7746	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000
<i>S. dentisani</i> 7747	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.233 $\pm$ 0.055

### 3.7.3 [Análisis de hidrólisis de sales biliares](#)

En la Tabla 4.14 se recogen los resultados obtenidos para la hidrólisis de sales biliares.

**Tabla 4.14.** Actividad hidrolasa de sales biliares obtenida en el sobrenadante de cultivo y en el extracto celular obtenido tras la lisis celular por procedimientos mecánicos.

Cepa	Actividad BSH (U.I./ml de sobrenadante)		Actividad BSH (U.I./mg de proteína en el extracto celular)	
	Glicina	Taurina	Glicina	Taurina
<i>S. dentisani</i> 7746	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<i>S. dentisani</i> 7747	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

## 3.8 Escalado del proceso fermentativo y obtención de biomasa

### 3.8.1 [Optimización de los parámetros y condiciones de crecimiento a pequeña escala](#)

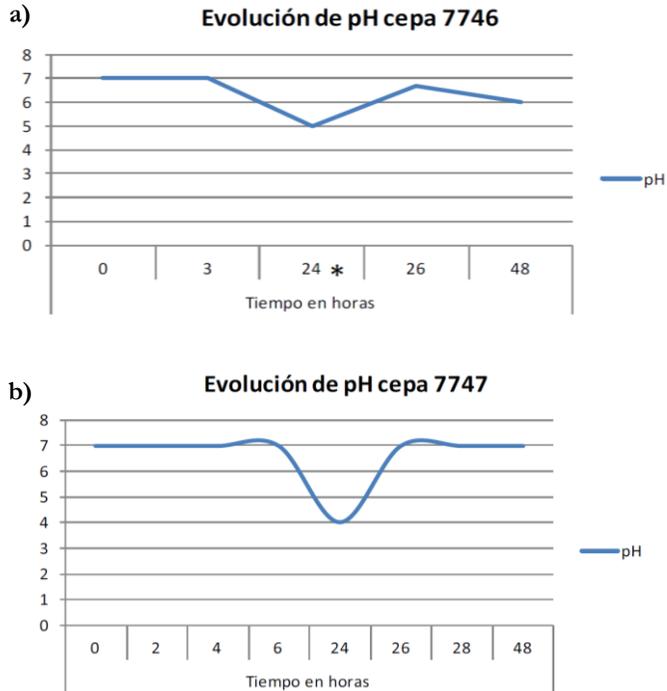
Los parámetros para el correcto crecimiento de las cepas 7746 y 7747 fueron los mismos a pequeña escala 500 ml, teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

Temperatura	Agitación	Tiempo de Crecimiento
37 °C	60 r.p.m.	48 h

Los resultados obtenidos tras el análisis de las tres condiciones de estudio, para ambas cepas fueron los siguientes:

- **pH**

La evolución del pH, a lo largo de las 48 horas de crecimiento bacteriano se representa en la Figura 4.14.



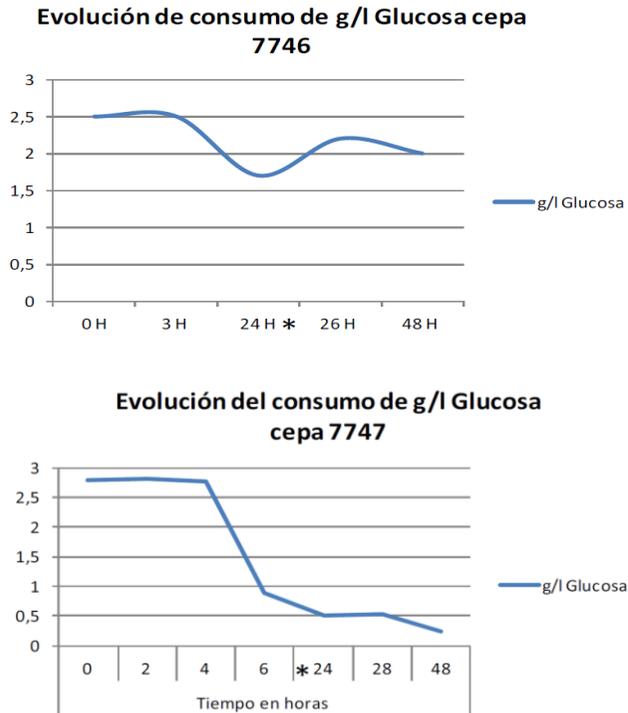
**Figura 4.14.** Evolución de pH para la cepa *S.dentisani* a) 7746 y b) 7747

Como se puede observar el pH del medio de cultivo, bajó por debajo de 5 tras 24 horas de crecimiento y tuvo que ser ajustado a pH 7. A partir de ese momento, para la cepa 7746 el pH fue disminuyendo conforme la bacteria crecía en el medio. Mientras que en la cepa 7747, el pH no varió durante las 24 horas restantes de incubación.

- **Glucosa**

Durante el crecimiento bacteriano, se tomaron muestras para medir la concentración de glucosa que tenía el medio de cultivo. Los resultados de la

cuantificación de glucosa, en el medio de cultivo, a lo largo del tiempo durante el crecimiento bacteriano, se grafican en la Figura 4.15.



**Figura 4.15.** Evolución de consumo de Glucosa en g/l, para la cepa *S.dentisani* 7746

El consumo de glucosa aumenta conforme va aumentando el crecimiento bacteriano. A las 24 horas de incubación se ajustó la concentración de glucosa a 2.5 gr/l. Durante las 24 horas siguientes, el consumo de glucosa no es muy alto para la cepa 7746, ya que la disminución de la concentración de glucosa en el medio no es significativa. En la cepa 7747, por el contrario, se observó que después del ajuste la concentración de glucosa siguió disminuyendo tras 24 horas de incubación adicionales. Transcurridas 48 horas de incubación, se midió la densidad óptica a 600 nm y se sembró para determinar el número de

Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro de medio de cultivo. Los resultados obtenidos se recogen en el Apéndice I.

Estos resultados nos indican que para la cepa 7746, la disminución del pH (hasta pH=5) y de la concentración de glucosa no afectan significativamente a las UFC. En tanto que para la cepa 7747, el ajuste de pH en el medio favorece el número de UFC, mientras que el ajuste de concentración de glucosa no es significativo y no afecta al número de UFC.

### 3.9. Escalado industrial para las cepas *S. dentisani* 7746 y 7747

Tras realizar dos procesos de fermentación, los parámetros fijados de crecimiento bacteriano a escalado industrial, en un fermentador de 100 litros se recogen en el Apéndice I.

Estos datos nos muestran que el pH para ambas cepas fue disminuyendo durante el crecimiento bacteriano. Por otra parte, la glucosa bajó durante el crecimiento, pero no se corrigió la concentración ya que se detectó que si se corrige la concentración, se inhibe el crecimiento bacteriano. Y por último, la densidad óptica medida a 600 nm bajó a las 18-20 horas tras corregir el pH, después se recuperó el crecimiento bacteriano y continuó creciendo. La fermentación se paró a las 22 horas, cuando se detectó una disminución de la D.O. y por tanto, de crecimiento bacteriano sin variación de pH.

Con los resultados observados se logró determinar que el rendimiento obtenido en la fermentación sin ajuste de glucosa ha mostrado mejores resultados para las dos cepas de *S. dentisani*, ya que se ha conseguido obtener más cantidad de biomasa celular y el recuento de Unidades Formadoras de Colonias fue de  $3,0 * 10^{10}$  ufc/gr y  $4,0 * 10^9$  ufc/gr, para las cepas 7746 y 7747 respectivamente.

### 3.10 Resistencia de las cepas de *S. dentisani* al proceso de congelación y liofilización

Tras finalizar el proceso de liofilización, los datos obtenidos de viabilidad, medidos en UFC para cada una de las cepas, bajo cada condición y/o crioprotector, se recogen en la Tabla 4.15.

**Tabla 4.15.** Resultados de viabilidad obtenidos en UFC, tras el proceso de liofilización, para las cepas *S. dentisani* 7746 y 7747.

#### Cepa *S. dentisani* 7746

Crioprotector	Biomasa Fermentación UFC/gr	Biomasa tras liofilización (t=0h) UFC/gr
Sin Crioprotector (PBS 1X)		$4.0 * 10^8$
5 % Maltodextrina	$3.0 * 10^{10}$	$3.3 * 10^{10}$
5 % Inositol		$6.1 * 10^{13}$

#### Cepa *S. dentisani* 7747

Crioprotector	Biomasa Fermentación UFC/gr	Biomasa tras liofilización (t=0h) UFC/gr
Sin Crioprotector (PBS 1X)		$1.2 * 10^8$
5 % Maltodextrina	$4.0 * 10^9$	$6.0 * 10^8$
5 % Inositol		$6.0 * 10^{12}$

Los resultados obtenidos para ambas cepas nos indican que, tras la congelación y posterior liofilización, en el control sin crioprotector la viabilidad no es estable y disminuye el número de Unidades Formadoras de Colonias UFC/g respecto al recuento inicial. Por otro lado, en cuanto a la maltodextrina, este crioprotector permite mantener el mismo crecimiento obtenido en el pellet inicial, pero disminuye la viabilidad. El Inositol, por su parte, permite una viabilidad celular estable con una tasa de crecimiento bacteriano mayor, debido a que las células no pierden viabilidad y están más concentradas al perder toda el agua residual.

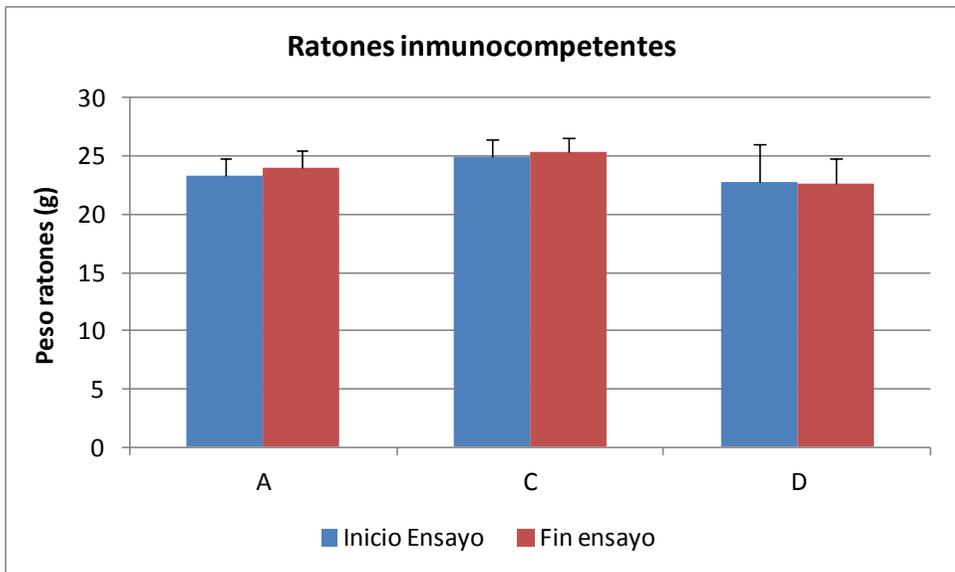
### 3.11 Ensayos de toxicidad en animales: Ingesta aguda de *S. dentisani* en modelo de ratón

#### RATONES INMUNOCOMPETENTES

Tras la administración de *S. dentisani* 7746 o 7747 se realizó un seguimiento del peso corporal de los animales

En la Figura 4.16, se observan las medias +/- DE, del peso al inicio y al final de la administración del inóculo, en los animales correspondientes a cada grupo de inmunocompetentes.

El análisis estadístico empleado (Kruskall Wallis test), indicó que no hubo diferencias significativas de peso, entre el inicio y final del ensayo en los grupos evaluados (P=0,089).



**Figura 4.16.** Peso corporal (en gramos) de los animales inmunocompetentes al inicio y al final de la administración del inóculo correspondiente.  
Grupo A: placebo; Grupo C: cepa 7746 y Grupo D: cepa 7747

### 3.11.1 Evaluación de la translocación de las cepas a órganos extraintestinales

Se registró crecimiento de bacterias en las siguientes muestras:

- Grupo A (placebo): n=7  
1 muestra de ganglio con 4 UFC/ganglio
  
- Grupo C (7746): n=8  
1 muestra de hígado con 3 UFC/órgano  
1 muestra de sangre con 10 UFC/ml de sangre
  
- Grupo D (7747): n=8  
1 muestra de hígado con 2 UFC/órgano  
2 muestras de sangre con 20 y 1000 UFC/ml

Las colonias aisladas fueron sujetas a identificación de *S. dentisani* por qPCR, dando negativas en todos los casos, por lo que se infirió que las colonias detectadas tanto en el grupo placebo como en los controles eran contaminación no proveniente del tratamiento.

### 3.11.2 Estudios histopatológicos de tubo digestivo

Se estudiaron en total 23 ratones y los parámetros estudiados fueron similares en los tres grupos de estudio. Entre los hallazgos particulares cabe mencionar un aumento leve del tejido linfoide del corion en algunas muestras del grupo D, así como la presencia de folículos linfoides en muestras puntuales de los otros grupos. Sin embargo, estas observaciones no exceden los parámetros considerados como normales.

En conclusión, se observaron cambios inespecíficos en todas las muestras estudiadas. Las alteraciones histopatológicas halladas fueron muy leves y no se consideran representativas de un proceso inflamatorio. La descripción detallada de la evaluación morfológica de tubo digestivo de ratón se puede encontrar en las Tablas 4.16, 4.17 y 4.18.

Tabla 4.16. Resumen de los resultados obtenidos en Duodeno en ratones inmunocompetentes

	Grupo A (Placebo)	Grupo C (7746)	Grupo D (7747)
	Rango	Rango	Rango
Relación Vellosidad/Cripta	3-4/1	3-4/1	4/1
Altura vellosidad	3-4	3-4	5-3
Nº células caliciformes por lado de vellosidad	5-7	5-7	5-7
Permeación linfocitaria intraepitelial	No se observó	No se observó	No se observó
Profundidad de la cripta	Normal	Normal	Normal
Presencia de folículos linfoides con centros germinales	No se observó	No se observó	No se observó
Presencia de folículos linfoides sin centros germinales	1/7(1FL)	4/8 (4FL)*	2 /8(2FL)*
Membrana basal	Normal o continua	Normal o continua	Normal o continua

\* casos observados sobre total de animales (número de folículos linfoides)

Tabla 4.17. Resumen de los resultados obtenidos en Yeyuno en ratones inmunocompetentes

	Grupo A (Placebo)	Grupo C (7746)	Grupo D (7747)
	Rango	Rango	Rango
Relación Vellosidad/Cripta	3-4/1	3-4/1	3-4/1
Altura vellosidad	2-4	2-4	3-4
Nº células caliciformes por lado de vellosidad	5-7	5-7	5-7
Permeación linfocitaria intraepitelial	No se observó	No se observó	No se observó
Profundidad de la cripta.	Normal	Normal	Normal
Presencia de folículos linfoides con centros germinales	No se observó	No se observó	No se observó
Presencia de folículos linfoides sin centros germinales	1/8 (1FL)*	No se observó	2/8(2FL)*
Membrana basal	Normal o continua	Normal o continua	Normal o continua

\* casos observados sobre total de animales (número de folículos linfoides)

**Tabla 4.18.** Resumen de los resultados obtenidos en Colon en ratones inmunocompetentes

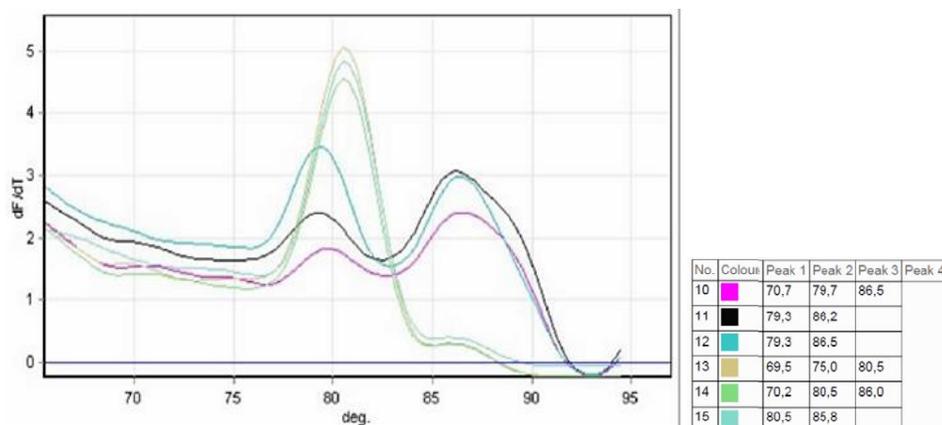
	<b>Grupo A (Placebo)</b>	<b>Grupo C (7746)</b>	<b>Grupo D (7747)</b>
<b>Permeación linfocitaria intraepitelial</b>	No se observó	5/8 (leve)*	No se observó
<b>Profundidad de la cripta.</b>	Normal	Normal	Normal
<b>Presencia de folículos linfoides con centros germinales</b>	No se observó	No se observó	No se observó
<b>Presencia de folículos linfoides sin centros germinales</b>	2/8 (2FL)**	1/8 (1FL)**	1/8(1FL)
<b>Membrana basal</b>	Normal o continua	Normal o continua	Normal o continua

\* casos observados sobre total de animales (aumento leve de infiltrado inflamatorio en el corion)

\*\* casos observados sobre total de animales (número de folículos linfoides)

### 3.11.3 Detección y cuantificación de las cepas en heces

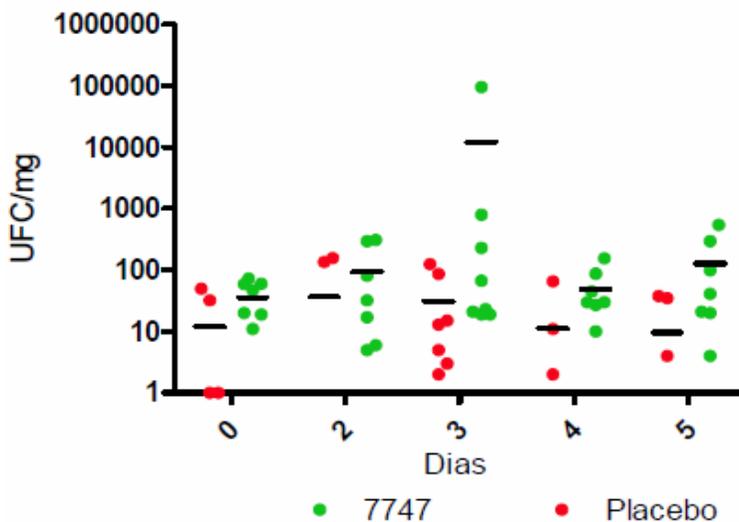
Para la cepa CECT 7746, se elaboró una curva estándar, donde cantidades conocidas de bacterias fueron agregadas a la materia fecal previa a la extracción de ADN. Esta curva permitió definir el límite de detección, que fue de  $1 \times 10^4$  UFC/mg de materia fecal. En los puntos de la curva estándar con concentraciones menores se amplifica un producto inespecífico cuya temperatura de melting no corresponde con la temperatura del amplicón específico ( $T_m = 80,5$ ; Figura 4.17).



**Figura 4.17.** Curva de “melting” de los puntos de la curva estándar por triplicado. Las muestras 10, 11 y 12 corresponden a una concentración de  $1 \times 10^3$  UFC/mg de material fecal y las muestras 13, 14 y 15 a una concentración de  $1 \times 10^4$  UFC/mg de material fecal.

Se analizaron las muestras de animales a los que se administró placebo o la cepa 7746. No fue posible observar amplificación de la cepa en ninguna de las muestras por lo que podría concluirse que la concentración en todos los casos fue menor a  $1 \times 10^4$  UFC/mg.

En el caso de la cepa CECT 7747, se elaboró de la misma manera una curva estándar, que permitió definir el límite de detección en 60 UFC/mg de materia fecal. Utilizando los primers diseñados para la cepa 7747, se obtuvo amplificación tanto para animales alimentados con placebo como para los alimentados con la cepa 7747, lo que supone un cierto grado de inespecificidad de los primers utilizados. En todos los días de muestreo el número de animales con amplificación detectable y la concentración de UFC fue mayor para el grupo administrado con la cepa 7747 que para el grupo placebo (Figura 4.18), aunque los valores en todos los casos menos en uno fueron menores de  $10^4$ . Los valores para cada animal se presentan en la Tabla 4.19.



**Figura. 4.18.** Cuantificación de la cepa 7747 en heces. Cada punto en el gráfico corresponde a la medida individual de un animal. Con una línea negra horizontal se marca la media de cada grupo. No se grafican los animales en los cuales no se obtuvo amplificación.

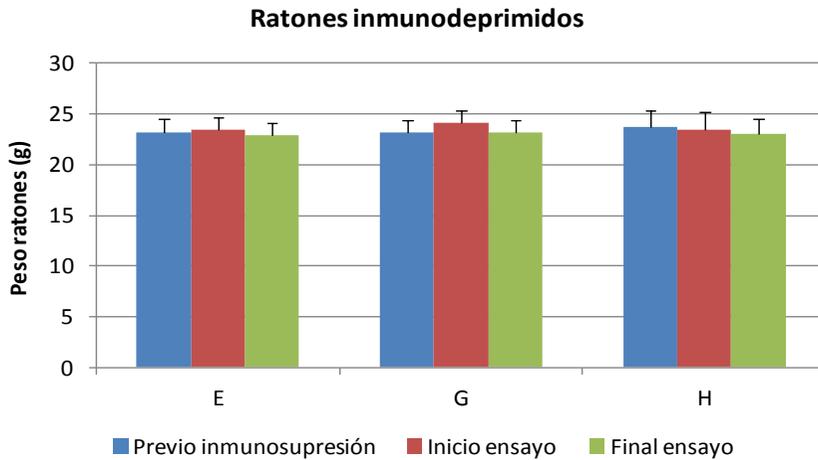
**Tabla 4.19.** UFC/mg de materia fecal obtenido para cada animal.

Grupo	Animal	Tiempo de ensayo (días)				
		Día 0	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Placebo	A0	50	136	125	66	35
	A1	ND	ND	87	ND	4
	A2	32	ND	2	11	38
	A3	ND	ND	3	2	ND
	A10	ND	ND	5	ND	ND
	A20	ND	157	15	ND	ND
	A30	ND	ND	13	13	ND
	A22	ND	ND	5	ND	ND
CECT 7747	D0	ND	5	19	10	296
	D1	19	296	795	27	99
	D2	20	81	95505	88	546
	D3	47	310	230	30	21
	D10	73	17	23	45	4
	D20	11	ND	19	ND	ND
	D30	60	32	21	155	20
	D22	59	6	67	30	41

ND: no detectable

### RATONES INMUNODEPRIMIDOS

Los resultados del seguimiento del peso corporal de los animales inmunodeprimidos, se recogen en la Figura 4.19.



**Figura 4.19.** Peso corporal (en gramos) de los animales inmunodeprimidos previo al protocolo de inmunosupresión, al inicio de la administración de las cepas y al final del ensayo. Grupo E: placebo; Grupo G: cepa 7746 y Grupo F: cepa 7747

Se pueden observar las medias +/- DE por grupo, tanto al inicio como al final del ensayo. El análisis estadístico empleado (Kruskall-Wallis test) indicó que no hubo diferencias significativas entre los grupos en los tiempos evaluados ( $P=0,1828$ ).

#### 3.11.4 Evaluación de la translocación de las cepas a órganos extraintestinales

Se registró crecimiento de bacterias en las siguientes muestras:

- Grupo E (placebo): n=8  
1 muestra de hígado con 10 UFC/órgano
  
- Grupo G (cepa 7746): n=8  
1 muestra de nódulos linfáticos mesentéricos con 150 UFC/órgano
  
- Grupo H (cepa 7747): n=8  
1 muestra de hígado con 2000 UFC/órgano

Los estudios de qPCR dieron negativos para *S. dentisani* tanto en las muestras de animales del grupo placebo como aquellos administrados con el probiótico, indicando que las colonias obtenidas pueden ser debidas a contaminaciones durante la manipulación de los animales o muestras.

#### 3.11.5 Estudios histopatológicos de tubo digestivo

Se estudiaron en total 23 ratones y los parámetros estudiados fueron similares en los tres grupos de estudio. Para los ratones inmunodeprimidos los resultados obtenidos fueron iguales a los de los ratones inmunocompetentes, con un ligero aumento del tejido linfóide del corion en algunas muestras del grupo D y presencia de folículos linfoides en muestras puntuales de los otros grupos. En las tablas 4.20, 4.21, 4.22, se recoge la descripción detallada por grupo de la evaluación morfométrica de tubo digestivo de ratón inmunodeprimido.

**Tabla.4.20.** Resumen de los resultados obtenidos en Duodeno en ratones inmunodeprimidos

	Grupo E (Placebo)		Grupo G (7746)		Grupo H (7747)	
	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media
Relación Velloso/Cripta	3-4/1	3,9/1	4/1	4/1	4/1	4/1
Altura velloso	3-4	3,9	4	4	4	4
Nº células caliciformes por lado de velloso	5-7	6	5-7	6	5-7	6
Permeación linfocitaria intraepitelial	No se observó		No se observó		No se observó	
Profundidad de la cripta.	Normal		Normal		Normal	
Presencia de folículos linfoides con centros germinales	No se observó		No se observó		No se observó	
Presencia de folículos linfoides sin centros germinales	1/8(1FL)*		No se observó		No se observó	
Membrana basal	Normal o continua		Normal o continua		Normal o continua	

\* casos observados sobre total de animales (número de folículos linfoides)

**Tabla.4.21.** Resumen de los resultados obtenidos en Yeyuno en ratones inmunodeprimidos

	Grupo E (Placebo)		Grupo G (7746)		Grupo H (7747)	
	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media
Relación Velloso/Cripta	3/1	3/1	3/1	3/1	3-4/1	3,5/1
Altura velloso	3	3	3-4	3,1	3-4	3,5
Nº células caliciformes por lado de velloso	3-7	5,8	5-7	6	5-7	6
Permeación linfocitaria intraepitelial	No se observó		No se observó		No se observó	
Profundidad de la cripta.	Normal		Normal		Normal	
Presencia de folículos linfoides con centros germinales	No se observó		No se observó		No se observó	
Presencia de folículos linfoides sin centros germinales	4/8 (4FL)*		1/8 (4FL)*,†		No se observó†	
Membrana basal	Normal o continua		Normal o continua		Normal o continua	

\* casos observados sobre total de animales (número de folículos linfoides)

**Tabla.4.22.** Resumen de los resultados obtenidos en el Colon de los ratones inmunodeprimidos

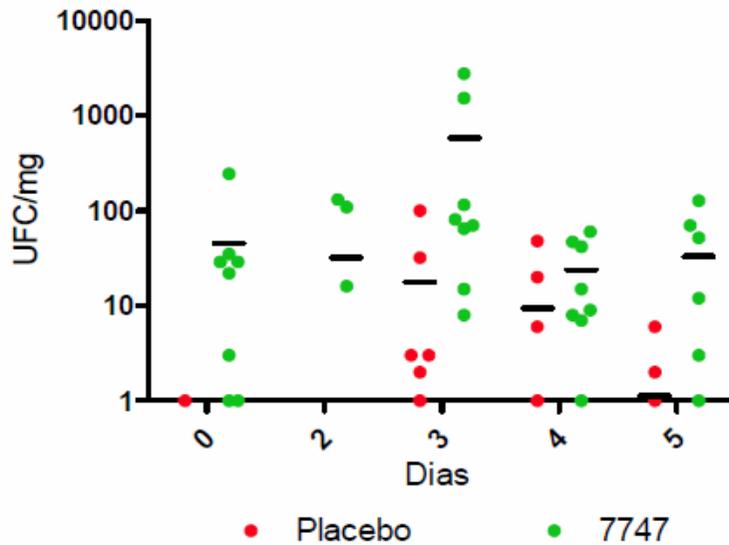
	<b>Grupo E (Placebo)</b>	<b>Grupo G (7746)</b>	<b>Grupo H (7747)</b>
<b>Permeación linfocitaria intraepitelial</b>	No se observó	No se observó	5/8 (leve)*
<b>Profundidad de la cripta.</b>	Normal	Normal	Normal
<b>Presencia de folículos linfoides con centros germinales</b>	No se observó	No se observó	No se observó
<b>Presencia de folículos linfoides sin centros germinales</b>	2/8 (2FL)*	1/8 (1FL)*	2/8(4FL)
<b>Membrana basal</b>	Normal o continua	Normal o continua	Normal o continua

\* casos observados sobre total de animales (aumento leve de infiltrado inflamatorio en el corion)

### 3.11.6 Detección y cuantificación de las cepas en heces

De igual forma que en los animales inmunocompetentes, no fue posible observar amplificación en ninguna de las muestras de animales a los que se administró placebo y la cepa 7746, por lo que puede concluirse que la concentración en todos los casos fue menor a  $1 \times 10^4$  UFC/mg.

Para la cepa CECT 7747, se elaboró también una curva estándar con cantidades conocidas de bacterias y utilizando los primers diseñados previamente, se obtuvo amplificación tanto para animales alimentados con placebo, como para los alimentados con la cepa CECT 7747, lo cual supone un grado de inespecificidad de los primers usados. En todos los días de muestreo el número de animales con amplificación detectable y la concentración de UFC fue mayor para el grupo administrado con la cepa CECT 7747 que para el grupo placebo, aunque en todos los casos los valores de UFC/mg fueron inferiores a  $10^4$  (Figura 4.20). Los valores para cada animal se observan en la Tabla 4.23.



**Figura 4.20.** Cuantificación de la cepa CECT 7747 en heces. Cada punto en el gráfico corresponde a la medida individual de un animal. Con una línea negra horizontal se marca la media de cada grupo. No se grafican los animales en los cuales no se obtuvo amplificación.

**Tabla 4.23.** UFC/mg de materia fecal obtenido para cada animal.

Grupo	Animal	Tiempo de ensayo (días)				
		Día 0	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Placebo	E0	ND	ND	ND	ND	ND
	E1	1	ND	32	20	2
	E2	ND	ND	2	ND	ND
	E3	ND	ND	ND	ND	ND
	E10	ND	ND	3	1	ND
	E20	ND	ND	1	48	1
	E30	ND	ND	3	ND	ND
	E22	ND	ND	100	6	6
CECT 7747	H0	35	109	1535	1	127
	H1	29	ND	115	47	12
	H2	1	131	81	15	52
	H3	1	16	65	7	1
	H10	29	ND	70	9	3
	H20	244	ND	8	42	ND
	H30	22	ND	15	8	ND
	H22	3	ND	2775	60	70

ND: no detectable

## 4. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos en el presente capítulo podemos concluir, por un lado, que los resultados de temperatura óptimo eran esperables, ya que al tener en cuenta que las cepas fueron aisladas de la cavidad oral de pacientes sanos, la temperatura óptima ideal de crecimiento sería lo más cercana a la temperatura del huésped. Este dato es de gran ayuda si lo que se pretende es cultivar a escala industrial a *S. dentisani*, ya que es uno de los puntos críticos para obtener una mayor masa celular bacteriana. Así mismo, los recuentos de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) obtenidas en los ensayos, permiten inferir que las cepas pueden ser usadas en productos lácteos y sus derivados, ya que utilizan los nutrientes del medio para su crecimiento exponencial. Además se evidencia un descenso del pH que se correlaciona con la capacidad de *S. dentisani* para fermentar la lactosa produciendo ácido láctico y acidificando el medio. La fermentación de lactosa se corroboró en las pruebas de tiras API (Capítulo 1).

Por otro lado, los ensayos de inhibición durante diferentes etapas de crecimiento bacteriano, nos permitió concluir que el mayor efecto inhibitorio de las cepas es producido cuando llegan a fase estacionaria, es decir cuando las bacterias comienzan a agotar los nutrientes del medio, a medida que la tasa de crecimiento bacteriano se iguala con la tasa de muerte bacteriana. Es posible por tanto, que las sustancias inhibitorias se produzcan en situaciones de stress nutricional para las bacterias, aunque tampoco se puede descartar que el mecanismo de producción del inhibidor esté determinado por la densidad celular, como ocurre en los l-antibióticos regulados por moléculas de Quorum Sensing (Kleerebezem Michiel, 2003). En el capítulo 3, sin embargo, determinamos que la expresión de los genes de bacteriocinas es superior en fase exponencial, lo cual sugiere que la mayor inhibición del sobrenadante recogido

en fase estacionaria se debe a una mayor acumulación de los péptidos y no a una mayor producción de los mismos en condiciones de stress.

En cuanto a la resistencia a antibióticos, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) observadas permiten plantear que la cepas de *Streptococcus dentisani* sp. nov., no presentan resistencias a la gran mayoría de antibióticos usados actualmente en clínica. Los únicos CMI altos que obtuvimos se corresponden con antibióticos aminoglucósidos, que suelen estar indicados principalmente en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram negativas y en muchos casos la posología es en combinación con otro tipo de antibiótico, como un betalactámico o vancomicina. Además, los genes de resistencia a antibióticos detectados no se encuentran dentro de elementos móviles. Por tanto, el uso de la cepa como probiótico podría considerarse como seguro, ya que no sería recomendable usar microorganismos en alimentos funcionales si presentan una amplia gama de resistencia a antibióticos, que potencialmente pueda ser transferida a otras especies bacterianas.

Respecto a los ensayos en el digestor artificial, los resultados obtenidos permitieron demostrar que la viabilidad de las cepas se mantiene en la boca, tras el proceso de masticación, pero no sobreviven a los procesos de digestión gástrica ya que afectan por completo la viabilidad de las bacterias. En nuestro caso, es un resultado ideal, puesto que el mecanismo de acción de *S. dentisani* está enfocado a nivel oral, a diferencia de un probiótico intestinal. Además, que no sobreviva al paso por el estómago, nos permite dar más seguridad en el uso de la cepa, ya que tras ejercer su efecto en el nicho oral perdería viabilidad y no lograría colonizar otros nichos del cuerpo.

Tras evaluar la producción de metabolitos no deseados, se evidenció que las cepas de *S. dentisani* no producen aminas biógenas, ni hidrólizan sales biliares. En

cuanto al mejor crioprotector para conservar la viabilidad de las cepas 7746 y 7747, el inositol al 5% es el que mostró mejores resultados tras un proceso de liofilización. Finalmente, los resultados de escalado dan por sentado que la producción a gran escala es viable, tanto industrial, como económicamente. Así mismo, la concentración eficaz terapéutica de *S. dentisani* debería ser de  $10^8$  UFC, debiendo aumentar esta dosis dependiendo de la posible pérdida a la hora de la aplicación. De hecho, en los ensayos clínicos posteriores a la terminación de la presente tesis, se utilizaron dosis individuales de  $10^9$  CFUs administradas de forma diaria durante una o dos semanas.

Por último, en los ensayos de toxicidad en animales tanto inmunosuprimidos, como inmunocompetentes se concluye que, por un lado, al igual que el grupo de ratones control, los cambios a nivel histológico fueron pocos e inespecíficos y las alteraciones histopatológicas fueron tan leves que no se consideran representativas de un proceso inflamatorio. Por otro lado, en la evaluación de la translocación de las cepas a órganos extraintestinales, las UFC encontradas en muestras de hígado y sangre tras qPCRs específicas no se correspondían con *S. dentisani*, puede que fueran contaminaciones durante la manipulación de los animales o muestras. En cuanto a la cuantificación específica de las cepas 7746 y 7747 en heces, para la cepa 7746 tras no observar amplificación, se concluye que la concentración de la cepa pueda ser menor a  $1 \times 10^4$  UFC/mg. En cambio, para la cepa 7747 sí se obtuvo amplificación, pero en el grupo placebo también, lo que supone un cierto grado de inespecificidad de los primers utilizados.

En conclusión, todos los resultados obtenidos nos dan las herramientas necesarias para demostrar la seguridad y viabilidad del uso y fabricación de las cepas de *S. dentisani* como probióticos orales, cuyo escalado industrial y estabilidad deberán ser optimizados en el futuro.

## DISCUSIÓN GENERAL

---



## DISCUSIÓN GENERAL

La caries dental es considerada la enfermedad más prevalente a nivel mundial, ya que afecta a entre un 60% y un 90% de los niños en edad escolar, y a una gran mayoría de la población adulta en algún momento de sus vidas (90%) (Petersen and Lennon, 2004). Se caracteriza principalmente por la destrucción de los tejidos del diente como resultado de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana (Marsh, 1994). Sin embargo las estrategias de tratamiento y prevención han sido ineficaces, debido a la naturaleza propia de la patología, ya que al ser una enfermedad multifactorial y de tipo polimicrobiano (Fejerskov, 2004; Simón-Soro and Mira, 2015), tanto las estrategias de inmunización pasiva, como las activas (i.e. una vacuna) no llegan a ser totalmente útiles.

Como tratamientos preventivos, para reducir la incidencia, prevalencia y gravedad de las lesiones se han usado sustancias como el flúor, la clorhexidina, el xilitol y agentes remineralizantes. En cuanto a las estrategias de inmunización, éstas han buscado principalmente atacar los factores involucrados en la adhesión y acumulación bacteriana. Los trabajos realizados encaminados a una inmunización activa, no han alcanzado hasta ahora niveles protectores de anticuerpos, que permitan hablar de una vacuna desarrollada contra la enfermedad. En cuanto a aproximaciones de inmunización pasiva estas han sido enfocadas a la producción de anticuerpos, pero solamente dirigidos contra antígenos de superficie de *S. mutans*. Varios autores consideran que con este tipo de enfoques no puede desarrollarse una vacuna definitiva frente a la caries dental por dos motivos principales: por un lado, por estar involucradas varias especies bacterianas cariogénicas en el desarrollo de la enfermedad, haciendo poco eficientes las estrategias antimicrobianas dirigidas a un sólo patógeno (Simón-

Soro and Mira, 2015; Mira, 2018); y por otro lado, por tratarse de una enfermedad con una alta variabilidad etiológica entre individuos (Aas *et al.*, 2008; Torlakovic *et al.*, 2012), incluso con grandes diferencias en composición bacteriana entre lesiones de caries presentes en un mismo individuo (Gross *et al.*, 2012; Simón-Soro *et al.*, 2014). Aunque el uso de dianas concretas puede no ser efectivo, el uso a bajas concentraciones de sustancias antisépticas o inhibidoras sí se ha propuesto como tratamiento (Marsh, 2018). De hecho el flúor, aparte de aumentar la resistencia al ácido del esmalte, también tiene un efecto inhibidor del metabolismo bacteriano, reduciendo la producción de ácido (Takahashi and Washio, 2011). En cualquier caso, la tendencia actual es desarrollar nuevas estrategias que no sean antimicrobianas, sino dirigidas a restablecer el equilibrio ecológico roto por la disbiosis (Mira, 2018; Marsh, 2018). Entre estas aproximaciones tenemos el uso de prebióticos y probióticos que favorezcan el crecimiento de bacterias beneficiosas.

Las estrategias basadas en la producción de sustancias alcali por parte de la microbiota oral se plantean como herramientas útiles en las nuevas alternativas de tratamiento gracias a los efectos tamponadores del pH, que favorecen la remineralización y disminuyen la aparición de lesiones (Gordan *et al.*, 2010). Por ejemplo, existen pastas de dientes en el mercado cuyo principio activo es la arginina, que al ser utilizado por ciertas bacterias beneficiosas contribuyen a tamponar el pH ácido mediante la producción de amonio, y varios ensayos clínicos han demostrado la eficacia de estos productos para reducir la aparición de caries (Ástvaldsdóttir *et al.*, 2010). El uso de urea, que también puede transformarse en amonio por la acción de las ureasas bacterianas, también ha sido propuesto (Nascimento *et al.*, 2009), aunque no se ha desarrollado en productos de higiene bucodental. Así pues, es importante identificar microorganismos orales con capacidad tamponadora y entender cómo favorecer

su crecimiento, o bien tratar de implantarlos en la cavidad oral como probióticos. Si estas bacterias fueran a la vez productoras de sustancias antimicrobianas, antagonistas de bacterias ácidogénicas asociadas a estados de enfermedad bucodental, esta doble acción podría ser una prometedora estrategia para prevenir la enfermedad.

Durante los últimos años se han aislado y propuesto bacterias con efectos probióticos cuyas funciones antimicrobianas y antiácidas hacen que sean candidatas prometedoras como herramientas en el tratamiento o prevención de la caries dental y otras enfermedades bucodentales. Sin embargo, es importante encaminar la búsqueda de posibles probióticos a organismos que también formen parte del nicho donde finalmente ejercerán su función (López-López *et al.*, 2018). El motivo es que incluso dentro de la cavidad oral existen múltiples nichos con bacterias adaptadas a cada uno de ellos (Simón-Soro *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015). De hecho ésta ha sido una de las desventajas más grandes en muchos de los probióticos bucodentales propuestos, ya que no han sido aislados del nicho donde finalmente deberían actuar, según la patología para la cual se han desarrollado.

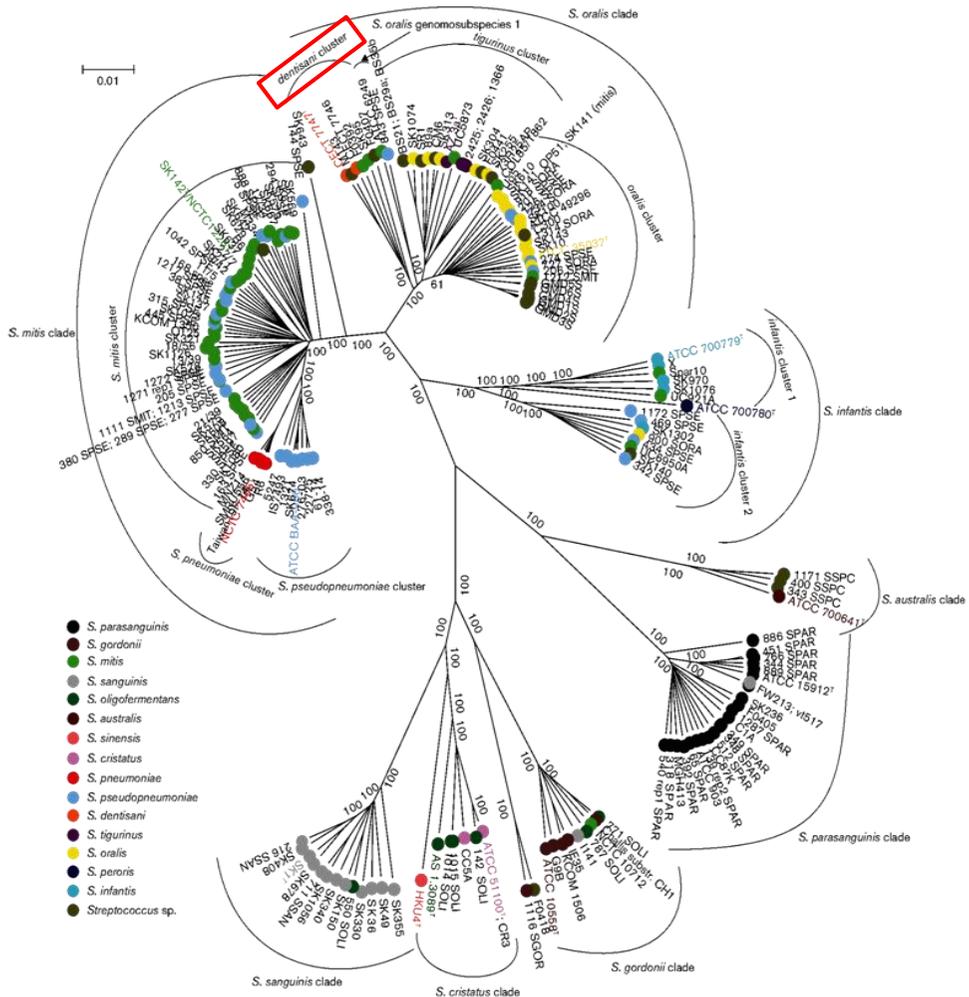
Un ejemplo de ello son las especies de *Lactobacillus* que, aunque son seguras y han probado eficacia en patologías intestinales, son detectadas en baja frecuencia en los tejidos dentales. Además, este tipo de microorganismos producen ácido y se han visto asociados a la aparición de lesiones de caries dental (Badet and Thebaud, 2008 ; Plonka *et al.*, 2012). En el caso de la cepa de *Streptococcus salivarius*, que sí habita el nicho oral, los estudios han demostrado que este tipo de microorganismo se asocia a tejidos blandos, siendo un habitante típico del epitelio de la boca, la lengua y el epitelio dorsal (Bowden *et al.*, 1979 ; Power *et al.*, 2008 ), y por ello sería ineficaz en el tratamiento de la caries dental por su incapacidad para colonizar el diente. De hecho, el análisis metagenómico del capítulo 1 muestra que el 99% de las muestras de placa dental

estudiadas tenían *S. dentisani*, mientras que *S. salivarius* no pudo ser detectado en casi ninguna muestra. Por ello, aunque esta bacteria pueda tener efectos antagonistas sobre *S. mutans*, las posibilidades de estar en contacto directo con el patógeno serían limitadas. Otras especies propuestas incluyen: *Streptococcus oligofermentans*, aislado de individuos sin caries dental (Tong, Gao and Dong, 2003), y que ha demostrado inhibir a *Streptococcus mutans* mediante la producción de peróxido de hidrógeno (Bao *et al.*, 2015); *Streptococcus salivarius* M18, que fue aislada de un sujeto sin caries (Chilcott and Tagg, 2007) y su potencial beneficioso se basa en dos perspectivas, de un lado la producción de bacteriocinas dirigidas a *S. mutans* y por otro lado, la producción de enzimas dextranasa y ureasa, que podrían ayudar a reducir la acumulación de placa dental y la acidificación respectivamente (Burton *et al.*, 2013). Otro ejemplo es el *Streptococcus* A12, aislado de placa supragingival de sujetos sin caries (Huang *et al.*, 2015) y que ha demostrado expresar una alta actividad del sistema arginina deiminasa (ADS), además de tener un efecto inhibitorio sobre *S. mutans* principalmente mediante la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de la piruvato oxidasa (Huang *et al.*, 2016).

En nuestro caso, el Grupo de Microbiología Oral del Centro Superior de Investigación en Salud Pública de Valencia (hoy Fundación FISABIO), liderado por el Dr. Alex Mira, descubrió una especie de *Streptococcus* aislado de muestras de placa dental de individuos sin caries que, mediante análisis de reclutamiento de secuencias realizados en esta tesis, se ha demostrado que está presente con mucha frecuencia en la placa dental de individuos sanos (98,3% para la cepa *S. dentisani* 7746 y 100% para la cepa *S. dentisani* 7747).

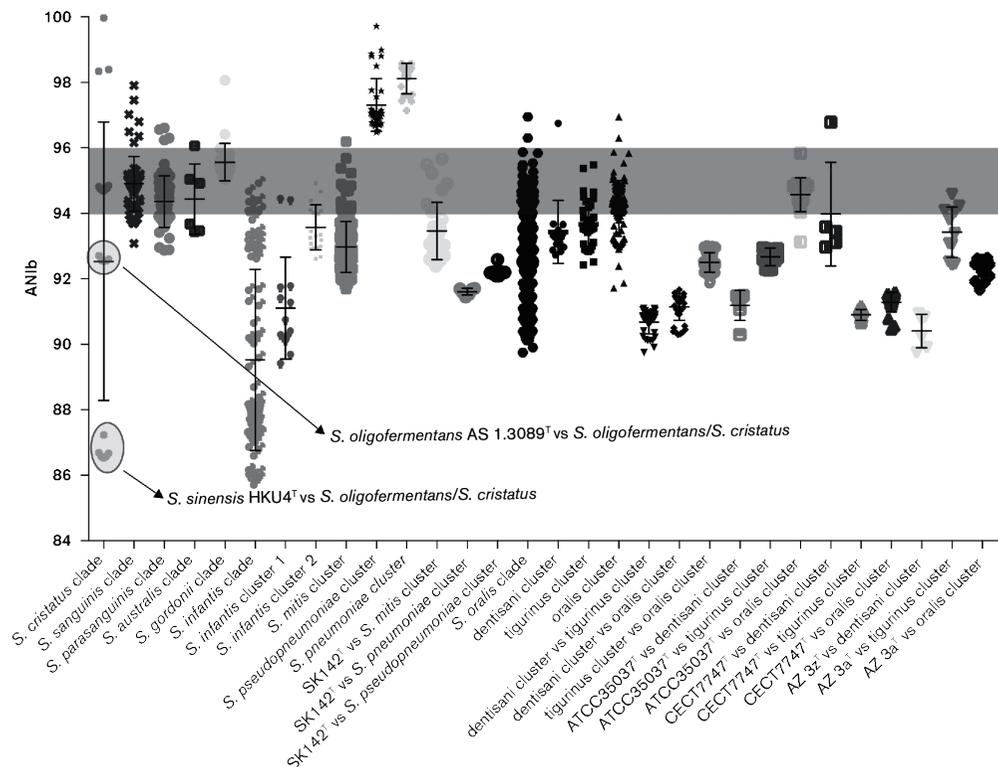
En el presente trabajo se propone que las cepas estudiadas constituyen una nueva especie en base a criterios filogenéticos, bioquímicos y genómicos. Con posterioridad a la publicación de nuestro trabajo, el prestigioso equipo del Dr. Kilian en Dinamarca realizó un extraordinario trabajo de filogenómica donde

utilizaron 195 genomas de *Streptococcus* para realizar arboles robustos con cepas pertenecientes al grupo mitis (Figura D.1) que incluye 4 cepas de *S. dentisani* secuenciadas, aparte de las dos iniciales secuenciadas en esta tesis (cepa CECT 7747T Accesion Number: NZ\_CAUK00000000 y la cepa CECT 7746 Accesion Number: NZ\_CAUI00000000) y que confirma que el grupo “dentisani” forma un cluster único y bien diferenciado del resto, en concreto de *S. oralis* y *S. tigurinus*.



**Figura D.1.** Árbol de mínima evolución basado en las secuencias de 195 genomas de GenBank pertenecientes a *Streptococcus* del grupo Mitis. Las secuencias están coloreadas de acuerdo con la anotación de especies en la base de datos GenBank y el cuadrado rojo resalta el cluster de *S. dentisani*. (Tomado de Jensen, Scholz and Kilian, 2016).

Sin embargo, los autores argumentan que las normas de límites entre especies no son aplicables a los estreptococos, y proponen que *S. dentisani* sea renombrado como subespecie dentro de *S. oralis*. Sin embargo, no utilizan el mismo criterio con *S. pneumoniae* a pesar de ser más parecido a *S. mitis* que *S. dentisani* a *S. oralis*. Si miramos los resultados de ANI (Figura D.2), reconocidos por la comunidad de taxónomos como el criterio más sólido para distinguir entre especies, los valores muestran que al describir la identidad genómica por pares entre el cluster *dentisani* o la cepa CECT 7747T de *S. dentisani* y los cluster de *figurinus* y *oralis*, se obtienen niveles bajos de identidad, por debajo del 92%. Por ello, consideramos que la propuesta de nombrar *S. dentisani* como subespecie de los *Streptococcus oralis* es arbitraria y poco adecuada.



**Figura D.2.** Valores ANIB (%) por pares, entre pares de cepas dentro de los mismos clados/clusters y entre cepas de diferentes clusters. Los valores de ANIB se calcularon utilizando la configuración predeterminada en el software jspecies v1.2.1 utilizando el algoritmo BLASTn (Goris *et al.*, 2007). El área sombreada entre un valor de ANIB de 94 a 96% indica el límite establecido para las especies procarióticas circunscritas taxonómicamente.

En cuanto a los mecanismos descritos en la presente tesis mediante los cuales *S. dentisani* ejerce un efecto potencialmente beneficioso frente a patologías orales, es importante resaltar que se evidencia un doble mecanismo de acción, mediado por una parte por bacteriocinas (efecto antagonista frente a ciertos patógenos) y, por otro lado, por un efecto tampón mediante la activación de la ruta arginolítica. En el caso de las bacteriocinas, es muy importante destacar que uno de los resultados incluidos en el Capítulo 2 es la identificación de la isla bacteriocinogénica ACDC en la cepa de *S. dentisani* 7746, cuyo potencial de aplicación es muy alto cuando finalmente se logren aislar, identificar y caracterizar todas las moléculas inhibitoras presentes en la mencionada isla. Podemos anticipar su posible uso con dos posibles aproximaciones: por un lado utilizando la cepa de *S. dentisani* como probiótico bucodental y por otra parte, sintetizando cada una de las bacteriocinas para que puedan ser usadas en pastas de dientes o en otros productos de higiene bucodental, seleccionando aquellos péptidos más ajustados a cada patología. Desde otra perspectiva, cobra mucha importancia la utilización de la ruta de la arginina por *S. dentisani*, ya que sería posible conseguir un fenómeno de sinergia del probiótico como tal con la arginina (a modo de prebiótico), lo que hoy en día se conoce como “simbiótico”. De hecho, trabajos posteriores a la terminación de esta tesis han demostrado que la combinación de *S. dentisani* con arginina en un modelo de biofilm oral *in vitro* tampona el pH de forma más eficiente que la arginina sola (López-López *et al.*, sin publicar). Por esta razón, se está realizando un ensayo clínico con humanos donde se está estudiando el efecto combinado de la aplicación de *S. dentisani* con el uso de una pasta de dientes con arginina. El descubrimiento descrito en esta tesis que demuestra la capacidad tamponadora de *S. dentisani* es muy alentador, dado que el pH ácido es la señal de activación para la ruta arginolítica, lo que la convierte en un mecanismo ideal para que la cepa ejerza su acción, al ser el pH ácido la causa misma de la caries dental. Si no

existiera esta autoregulación de la actividad productora de amonio, el pH oral podría verse aumentado sin control al administrar arginina o el probiótico, mientras que de esta manera el sistema gozaría de una señal activadora que coincide con el fenómeno que inicia la patología.

Por otro lado, las pruebas de capacidad tecnológica descritas en el Capítulo 4, nos permitieron demostrar la seguridad y la viabilidad industrial para producir la cepa de *S. dentisani* con un coste asequible y con la seguridad de poder usarla en humanos sanos, sin efectos adversos. En este momento el equipo de trabajo del Dr. Mira está trabajando en la formulación más adecuada para las cepas, teniendo en cuenta toda la información recabada tanto en las pruebas de aptitud tecnológica como en la experiencia recogida tras los primeros ensayos clínicos. Con la forma actual de aplicación, en un gel bucoadhesivo (Figura D.3), se pierde una parte importante del producto al quedarse en el recipiente y al retirar la férula dental de aplicación. Así mismo, se propone en base a la posible pérdida de viabilidad de las cepas en la boca y a la cantidad de *S. dentisani* presente en la boca de personas sanas, una posible dosis recomendada para una eficacia terapéutica de  $10^8$ - $10^9$  UFC totales de *S. dentisani*. Estas posibles pérdidas de viabilidad están documentadas en bacterias utilizadas como probióticos intestinales, como es el caso de *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572, *Lactobacillus acidophilus* LA 14, *Enterococcus faecium* UBEF-41, *Saccharomyces cerevisiae* sub. *Boulardii* MTCC-5375, entre otros (Vecchione *et al.*, 2018). Aunque las especies de *Lactobacillus* se consideran intrínsecamente resistentes a los ácidos, la tolerancia a los ambientes gástricos es una propiedad específica para cada una de las cepas independientemente del género al que pertenezcan. Así mismo, las formulaciones polimicrobianas han demostrado mejores resultados de resistencia frente a condiciones ácidas tras el paso por el estómago, probablemente debido a que su complejidad podría favorecer la

resistencia y adaptabilidad de estos consorcios microbianos a diferentes tipos de estrés ambiental.

Cabe resaltar que los datos de esta tesis muestran evidencia del potencial antagonico de *S. dentisani* frente a otras cepas diferentes a *Streptococcus mutans*. Por ello, podemos asegurar que el espectro de acción de *S. dentisani* no solo abarca la acción sobre bacterias cariogénicas como *S. mutans* o *S. sobrinus*, sino que también actúa sobre otros patógenos orales, lo que supone una posible explotación tecnológica enfocada a otras enfermedades de la cavidad oral, como la halitosis o la periodontitis. Por ejemplo, *S. dentisani* ejerce acción antagonica sobre *Fusobacterium nucleatum*, considerado un microorganismo puente que sirve de anclaje para que colonicen los periopatógenos como *Porphyromonas gingivalis* o *Treponema denticola* (Kolenbrander *et al.*, 1995; Periasamy and Kolenbrander, 2009). Además, inhibir el crecimiento de *Fusobacterium* podría ser una estrategia para reducir la cantidad de placa dental mediante la eliminación de organismos clave en la estructura del biofilm (Ferrer and Mira, 2016). Esta reducción de placa es fundamental para prevenir procesos como la caries y la periodontitis, ya que ambos se ven agravados por la presencia de placa (produciendo ácido y generando inflamación, respectivamente, ver Rosier *et al.*, 2018 para una revisión reciente). En este sentido, recientemente se ha reportado una disminución del índice de placa y del índice gingival (una medida de la inflamación de las encías) en un ensayo clínico con 60 personas a las que se les administró probiótico o placebo (Ferrer *et al.*, sin publicar). También es interesante que el sobrenadante de *S. dentisani* inhibe el crecimiento de *P. gingivalis*, patógeno clave en el desarrollo de las enfermedades periodontales (How, Song and Chan, 2016; Rafiei *et al.*, 2017), así como el de *Prevotella intermedia*, asociada tanto con enfermedad de las encías como con la halitosis. También *Fusobacterium* es una bacteria clave para el desarrollo de la halitosis, dado que produce diversos compuestos volátiles con azufre que son responsables de olor desagradable (Claesson *et al.*, 1990; Krespi,

Shrime and Kacker, 2006). Por ello, trabajos futuros deberían ir encaminados a determinar si la aplicación de *S. dentisani* como probiótico puede mejorar patologías como la enfermedad de las encías o la halitosis.

Algo a considerar a la hora de aplicar el probiótico en humanos, es que puede que teóricamente, este amplio espectro de acción de las bacteriocinas pudiera en algún momento asociarse con un efecto de “catástrofe ecológica” al cambiar considerablemente la composición bacteriana del hospedador. Sin embargo, en un ensayo *in vitro* realizado en el Academic Center for Dentistry Amsterdam (ACTA) no se observó un cambio excesivo en la composición, que consistió principalmente en una disminución de *Veillonella* (bacteria que utiliza lactato como fuente de carbono, y que por tanto es indicadora de la acidogenicidad de la placa), y en un aumento de *S. oralis* (patente Ref # P201031302 Inventor. “Anti-caries compositions and prebiotic/probiotics”). En un futuro, sería deseable comprobar los posibles cambios en la composición bacteriana oral *in vivo* tras la aplicación del *S. dentisani* en los ensayos clínicos. Es importante destacar que en los dos ensayos clínicos realizados hasta la fecha con *S. dentisani*, la colonización fue efectiva solamente de 2 a 3 semanas (Ferrer *et al.*, 2019). Por ello, no se espera un cambio drástico y radical sobre la microbiota del nicho, sino que es más probable una transición hacia especies menos acidogénicas, tal como indican los datos *in vitro* por la reducción en los niveles de *Veillonella*, que indicaría niveles bajos de ácidos orgánicos en la comunidad microbiana.

Por otro lado, en una publicación del año 2017, el grupo de Xiaohui C. Nielsen en Dinamarca describía la posibilidad de que *S. dentisani* pudiera producir endocarditis infecciosa (EI), tras aislar 6 cepas de pacientes con este cuadro clínico. Sin embargo, debemos resaltar que especies de *Streptococcus* comensales orales pueden en algún momento producir EI, pero esta

característica es dependiente totalmente de la cepa en concreto (Renton, Clague and Cooke, 2009; Zbinden *et al.*, 2012; Matsui *et al.*, 2013; Conrads *et al.*, 2018)).

Para prevenir este riesgo, realizamos pruebas de seguridad con las dos cepas de *S. dentisani* 7746 y 7747 en ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos, como se explica en el Capítulo 4. Los resultados mostraron un crecimiento normal de los animales, con ausencia de alteraciones histopatológicas en duodeno, yeyuno y colon y ausencia de bacteremia incluso cuando la dosis utilizada en ratones fue de  $10^9$  por sonda intra-gástrica, que es superior en varios ordenes de magnitud a los niveles cuantificados por Conrads y por nuestro grupo de trabajo.

De hecho, un dato importante para la correcta administración de los probióticos orales es la cuantificación de los niveles reales en la población, para que puedan ser establecidas las dosis más apropiadas, realistas y seguras. En nuestros ensayos clínicos realizados con la cepa 7746, con la dosis empleada el aumento en los niveles de *S. dentisani* fue de alrededor de 1 orden de magnitud, lo que significa que los individuos tratados nunca tendrán niveles del probiótico mayores que los encontrados en la población sana y por lo tanto, el riesgo de desarrollar algún tipo de patología o cuadro clínico como la endocarditis aguda es más bajo, que el ya presente en la población por presencia de bacterias orales con capacidad de causar estas patologías.

Todos los resultados observados en los experimentos enfocados a demostrar la seguridad de la cepa de *S. dentisani*, así como los ensayos en ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos, y la resistencia al proceso digestivo, permitieron obtener la información suficiente para poder pasar a la fase de ensayo clínico, donde tras la aplicación de la cepa no se han observado efectos secundarios o adversos en los individuos incluidos en los estudios. En el primer

ensayo, que fue un estudio piloto con 11 personas, se testó la capacidad de colonización y forma y dosis de administración del probiótico, en base a los resultados de la presente tesis (Ferrer *et al.*, 2019). En el segundo, realizado en 60 personas, se determinó el efecto de la aplicación del probiótico o un placebo en forma de gel bucodental (Figura D.3) en parámetros de salud oral, como el pH salival, la cantidad de lactato, el índice de placa o el flujo salival. En el tercer ensayo, todavía en curso, se está testando en 100 personas el efecto combinado del probiótico con una pasta estándar con 1500 ppm de flúor o con una pasta de flúor más arginina. Estos ensayos están siendo determinantes para valorar la eficacia real del probiótico y su futura aplicación y comercialización.



**Figura D.3.** Forma de administración del probiótico *S. dentisani* en gel bucodental. El liófilo, que contiene un agente espesante, se mezcla con agua para generar un gel denso en 20 segundos, el cual es recogido con una jeringa y depositado en una férula dental. La férula se aplica durante 2 minutos al día, maximizando el contacto entre el probiótico y las superficies dentales. En los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, el producto se ha aplicado por esta vía bien una vez o en multi-dosis, bien durante una semana o durante un mes en días alternativos.

Finalmente, y en base a toda la evidencia recogida en la presente tesis, proponemos de manera rotunda a las cepas de *Streptococcus dentisani* como probióticos, con un posible impacto para promover la salud bucodental. Actualmente existe un interés creciente en diferentes países como España, Colombia o Chile para implementar estrategias de tratamiento y/o prevención basadas en la utilización de la cepa de *S. dentisani*. Cabe anotar, que tras los resultados obtenidos en los primeros ensayos clínicos, sugerimos que la

formulación ideal sería un tratamiento inicial en gel para uso profesional en clínica (más concentrado) y otro de uso general, que pueda ser de fácil acceso y de venta al público, probablemente en menor concentración, que sirviera de mantenimiento tras la aplicación inicial de la cepa. Actualmente existen varias empresas multinacionales interesadas en el probiótico, y esperamos que el trabajo desarrollado en la presente tesis sirva para dar una base científica sólida al desarrollo de la bacteria como producto explotable comercialmente y que contribuya a mejorar la salud bucodental a nivel global.



## CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

Tras el desarrollo de la presente tesis, que incluía pruebas macroscópicas, microscópicas, bioquímicas, genómicas, de caracterización, de seguridad y de aptitud tecnológica en las cepas de *Streptococcus dentisani* sp. nov., 7746 y 7747, podemos concluir que:

1. Se consideran cocos Gram positivos, dispuestos en pares o cadenas, alfa hemolíticos, anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa negativos, caracterizados bioquímicamente por ser fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa, maltosa y lactosa positivos.
2. *S. dentisani* presenta un amplio espectro de acción, ya que no solamente inhibe a patógenos orales importantes como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* o *Prevotella intermedia*, sino que también actúa frente a microorganismos como *Fusobacterium nucleatum*.
3. Las moléculas inhibitoras producidas por *S. dentisani* son de naturaleza peptídica, donde la predicción de bacteriocinas *in silico* nos permitió identificar una "isla de bacteriocinas" en la cepa 7746, con cerca de 11 bacteriocinas diferentes y que se denominó ACDC.
4. Experimentalmente se detectaron 6 moléculas inhibitoras en total siguiendo la metodología descrita, de las cuales 4 fueron confirmadas por los datos de huella peptídica, estando todas localizadas en la isla ACDC.
5. Se sugiere que la mayor inhibición del sobrenadante de *S. dentisani* sea en fase estacionaria, probablemente debido a una mayor acumulación de los péptidos y no a una mayor producción de los mismos en condiciones de stress.
6. El genoma de *S. dentisani* 7746 y 7747 revela la presencia de la ruta arginolítica completa, y los experimentos, confirman que *S. dentisani* expresa genes de regulación del pH y de las dos rutas principales para la generación de sustancias álcali. La capacidad de *S. dentisani* para tamponar del pH ácido representa una capacidad beneficiosa extraordinaria, al poder combatir el pH ácido, que es la causa primaria de la desmineralización del esmalte.

7. En relación a la seguridad de las cepas, en los genomas disponibles no se han detectado genes de virulencia, ni presencia de elementos móviles. No producen aminas biógenas, ni hidrólizan sales biliares y en cuanto a la resistencia a antibióticos, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) observadas, permiten determinar que la cepas no presentan resistencias a la gran mayoría de antibióticos usados actualmente en clínica. Además, los genes de resistencia a antibióticos detectados no se encuentran dentro de elementos móviles. Por tanto, el uso de la cepa como probiótico podría considerarse como seguro, demostrado en experimentos *in vivo* en animales inmunosuprimidos e inmunocompetentes.
8. Tras experimentos en digestor artificial se demostró que las cepas se mantiene en la boca, tras el proceso de masticación. Sin embargo, no sobreviven a los procesos de digestión gástrica lo que nos permite dar más seguridad en el uso de la cepa, ya que tras ejercer su efecto en el nicho oral perdería viabilidad y no lograría colonizar otros nichos del cuerpo.
9. El mejor crioprotector para conservar la viabilidad de las cepas 7746 y 7747 tras un proceso de liofilización, es el inositol al 5%. Por otro lado, los resultados de escalado determinaron que la producción a gran escala es viable, tanto industrial, como económicamente.
10. La concentración eficaz terapéutica de *S. dentisani* debería ser de  $10^8$  UFC, debiendo aumentar esta dosis dependiendo de la posible pérdida a la hora de la aplicación.

En conclusión, todos los resultados obtenidos nos dan las herramientas necesarias para demostrar la seguridad y viabilidad del uso y fabricación de las cepas de *S. dentisani* como probióticos orales, cuyo escalado industrial y estabilidad deberán ser optimizados en el futuro. Finalmente, y en base a toda la evidencia recogida en la presente tesis, proponemos de manera rotunda a las cepas de *Streptococcus dentisani* como probióticos, con un posible impacto para promover la salud bucodental.

## APÉNDICE

### 1. INFORME SOBRE LA PRUEBAS PILOTO DE FERMENTACIÓN, LIOFILIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE *S. dentisani*

---





# Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*



Informe elaborado para:



29 de octubre de 2014

Autores:

Dra. Ana Chinchilla

Dra. M<sup>a</sup> Pilar de Castro

Dr. Juan R. Muñoz-Montaño



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

**OBJETO DEL PROYECTO**

El objetivo del proyecto es el de establecer las condiciones básicas para optimizar el crecimiento, liofilización y estabilidad de dos cepas de *S. dentisani* (7746 y 7747). Las condiciones deseadas propuestas fueron:

- Escalado del proceso fermentativo
- Obtención de la cantidad mínima esencial de biomasa para que el proceso industrial sea económicamente viable
- Optimización del proceso de liofilización
- Análisis de estabilidad del producto final en condiciones climáticas 2

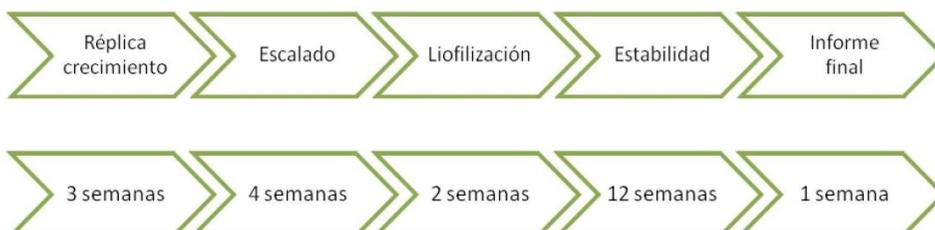
**Actividades Planificadas**

Se planificaron las siguientes actividades:

- 1.- Réplica de condiciones de crecimiento
- 2.- Escalado en un fermentador de 100L para alcanzar niveles de biomasa en cfu  $10E^{12}$ - $10E^{13}$
- 3.- Condiciones óptimas de liofilización
- 4.- Ensayos de estabilidad forzada en 3 meses en condiciones climáticas 2
- 5.- Informe de los resultados obtenidos.

Estas tareas fueron planificadas para ser ejecutadas en 22 semanas según se indica en el siguiente Cronograma

**Actividades**





Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

**ACTIVIDADES PLANIFICADAS**

1. Optimización de los parámetros y condiciones de crecimiento a pequeña escala de *S. dentisani* de las cepas 7746 y 7747.
2. Escalado industrial del cultivo de *S. dentisani* cepas 7746 y 7747.
3. Liofilización de la biomasa celular de *S. dentisani* cepas 7746 y 7747 con diferentes crioprotectores.

1. Optimización de los parámetros y condiciones de crecimiento a pequeña escala de *S. dentisani* de las cepas 7746 y 7747.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de ambas cepas de *S. dentisani* es el Tryptic Soy Broth (TSB), un medio de crecimiento general.

Ambas cepas se han crecido a pequeña escala en matraces de 500 ml para optimizar los parámetros y condiciones de crecimiento. Para ello, se han fijado los siguientes parámetros:

- Temperatura
- Agitación
- Tiempo de Crecimiento

La optimización del crecimiento bacteriano se ha realizado analizando tres condiciones:

- Control: Crecimiento bacteriano en términos de D.O.<sub>600nm</sub>.
- Determinación de la variación de pH del medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano y ajuste del mismo a un valor entre 5-7.
- Determinación del consumo de glucosa y ajuste de glucosa del medio de cultivo a 2,5 gr/l.

En cada una de las condiciones de estudio se han cogido muestras de cultivo a diferentes tiempos y se han medido los siguientes parámetros:

Condición de Estudio	Medida de D.O. <sub>600nm</sub>	pH	Glucosa	Contaje de ufc/ml a tiempo final
Control	X	X	X	X
Ajuste de pH	X	X	----	X
Ajuste de Glucosa	X	----	X	X

Los resultados obtenidos indicarán qué condiciones hay que ajustar para el correcto crecimiento bacteriano.

2. Escalado industrial del cultivo de *S. dentisani* cepas 7746 y 7747.

Una vez que se determinen los parámetros de crecimiento bacteriano y las condiciones de cultivo (ajuste de pH y concentración de glucosa del medio), se realizará un escalado a un fermentador, en el



*Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de S. dentisani*

---

que se optimizarán los parámetros para obtener una buena cantidad de biomasa bacteriana. Los parámetros que se van a controlar son:

- Temperatura
- Oxigenación
- pH
- Tiempo de crecimiento

Se fijarán los parámetros en los que el crecimiento bacteriano es óptimo y se obtiene mayor cantidad de biomasa celular.

3. Liofilización de la biomasa celular de *S. dentisani* cepas 7746 y 7747 con diferentes crioprotectores.

Una vez obtenida la biomasa celular procedente de la fermentación de las cepas se dividirá en tres porciones y se estudiará qué crioprotector es el mejor para mantener la viabilidad celular tras el proceso de congelación y liofilización de las bacterias.

La biomasa celular se divide en tres porciones y se estudiarán los siguientes crioprotectores:

- Control, Sin Crioprotector: biomasa celular + PBS 1x.
- Maltodextrina: biomasa celular + 5% maltodextrina.
- Inositol: biomasa celular + 5% inositol.

Se determinarán las unidades formadoras de colonia que contiene la biomasa celular tras la fermentación y se analizará la viabilidad de las células con los crioprotectores tras el proceso de liofilización.



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

**RESULTADOS OBTENIDOS**

Los resultados se van a exponer en orden para cada una de las cepas.

***S. dentisani* cepa 7746:**

1. Optimización de los parámetros y condiciones de crecimiento a pequeña escala de *S. dentisani* de la cepa 7746

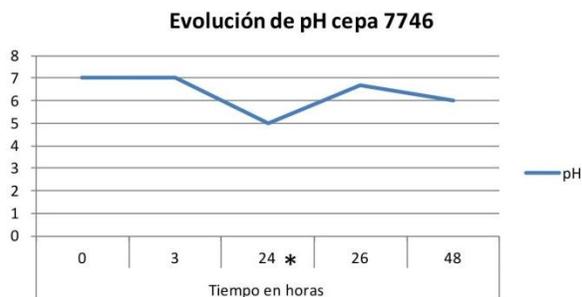
Los parámetros determinados para el correcto crecimiento de la cepa 7746 a pequeña escala son:

Temperatura	Agitación	Tiempo de Crecimiento
37 °C	60 r.p.m.	48 h

Los resultados obtenidos tras el análisis de las tres condiciones de estudio de la cepa 7746 son los siguientes:

- **pH:** Durante el crecimiento bacteriano se han tomado muestras para medirle el pH del medio y se le ha ajustado a pH entre 6-7.

La evolución del pH a lo largo de las 48 horas de crecimiento bacteriano es:



\* A las 24 horas se ajusta la concentración de pH en el medio de cultivo a pH= 7

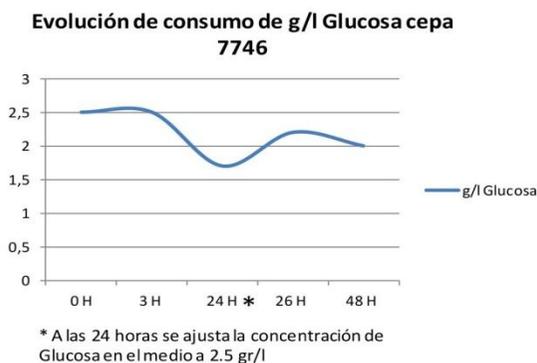
Como se observa en la gráfica, el pH bajó por debajo de 5 a las 24 horas de crecimiento y se le ajustó a pH 7. A partir de ahí, el pH fue disminuyendo conforme la bacteria crecía.

- **Glucosa:** Durante el crecimiento bacteriano se han tomado muestras para medir la concentración de glucosa que tenía el medio de cultivo y se le ha ajustado a 2.5 gr/l.



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

El resultado de la cuantificación de glucosa en el medio de cultivo a lo largo del tiempo de crecimiento bacteriano es:



El consumo de glucosa aumenta conforme va aumentando el crecimiento bacteriano. A las 24 horas se le ajustó la concentración de glucosa y se observa que las 24 horas siguientes el consumo no es muy alto, ya que la disminución de la concentración de glucosa en el medio no es significativa.

Una vez finalizadas las 48 horas de crecimiento, se les midió el crecimiento bacteriano (D.O.<sub>600nm</sub>) y se sembró el último tiempo para determinar las unidades formadoras de colonia por mililitro de medio de cultivo obtenidas. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Cepa	Control (sin ajustar nada)		Ajuste de pH		Ajuste de Glucosa	
	D.O. <sub>600nm</sub>	Ufc/ml	D.O. <sub>600nm</sub>	Ufc/ml	D.O. <sub>600nm</sub>	Ufc/ml
7746	0.4265	2.4 * 10 <sup>7</sup>	0.3840	1.8 * 10 <sup>7</sup>	0.5635	1.7 * 10 <sup>7</sup>

Estos datos indican que la disminución del pH (hasta pH=5) y de la concentración de glucosa no afecta el crecimiento bacteriano.

2. Escalado industrial del cultivo de *S. dentisani* cepa la 7746

Tras realizar dos procesos de fermentación, los parámetros fijados de crecimiento bacteriano en el escalado industrial en un fermentador son los siguientes:

pO2%	Agitación (r.p.m.)	Temperatura	Tiempo Crecimiento
3%	100	37 °C	22 h



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

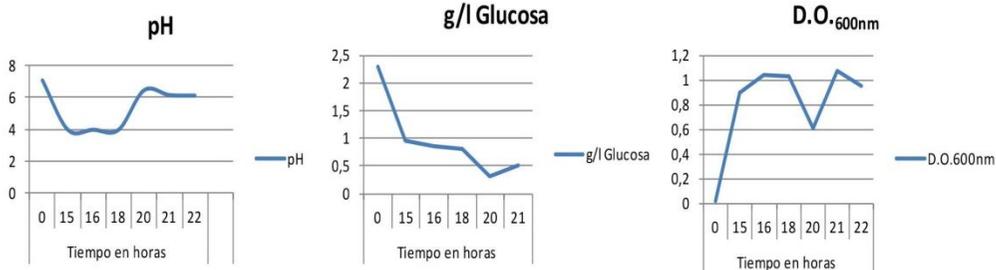
El tiempo de incubación de la fermentación es de 22 horas ya que a partir de este tiempo disminuye el crecimiento bacteriano y la bacteria no es viable.

Los resultados obtenidos de evolución de pH, consumo de glucosa y crecimiento bacteriano a lo largo de las 22 horas de incubación son los siguientes:

Tiempo	0 h	15 h	16 h	18 h*	20 h	21 h	22 h	gr pellet celular	ufc/gr pellet celular
pH	7,1	4,0	4,0	4,0	6,48	6,18	6,15	110	3,0 * 10 <sup>10</sup> ufc/gr
Glucosa (g/l)	2,28	0,946	0,845	0,816	0,322	0,509	----		
D.O.600nm	0,016	0,893	1,038	1,028	0,608	1,076	0,947		

\* ajuste de pH a 6.5

La representación gráfica de estos datos es:



Estos datos lo que nos indican es:

- El **pH** fue disminuyendo durante el crecimiento bacteriano y se le ajustó el pH a 6.5 a tiempo 18 horas.
- La **glucosa** bajó durante el crecimiento bacteriano, pero no se corrigió la concentración ya que se detectó que si se corrige la concentración al cultivo se inhibe el crecimiento bacteriano.
- La **D.O.** bajó a las 20 horas al corregirle el pH, después se recuperó y continuó creciendo. La fermentación se paró a las 22 horas cuando se detectó una disminución de D.O. y por tanto de crecimiento bacteriano sin variación de pH.
- El rendimiento obtenido en la fermentación sin ajuste de glucosa, ha sido mucho mejor. Se ha obtenido más cantidad de biomasa celular y el contaje de ufc/gr de pellet es de 3,0 \* 10<sup>10</sup> ufc/gr.

3. Liofilización de la biomasa celular de *S. dentisani* cepa 7746 con diferentes crioprotectores.

Tras el proceso de liofilización, los datos obtenidos de viabilidad al sembrar las unidades formadoras de colonia de cada condición, crioprotector, son los siguientes:



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

---

Crioprotector	Biomasa Fermentación Ufc/gr	Biomasa tras la liofilización (t=0h) ufc/gr
Sin Crioprotector (PBS 1x)	$3.0 * 10^{10}$	$4.0 * 10^8$
5% Maltodextrina		$3.3 * 10^{10}$
5% Inositol		$6.1 * 10^{13}$

El proceso de liofilización se ha realizado correctamente. El líofilo de cada condición se ha envasado en viales de vidrio transparente tipo I.

El resultado obtenido indica que:

- Control, Sin Crioprotector: tras la congelación y la liofilización la viabilidad no es estable y disminuye.
- Maltodextrina: tras liofilizar, mantiene el mismo crecimiento obtenido en el pellet celular tras la fermentación, pero disminuye la viabilidad inicial.
- Inositol: es el mejor crioprotector ya que la viabilidad es estable y al liofilizar la biomasa, se obtiene una tasa de crecimiento mayor, debido a que las células no pierden viabilidad y están más concentradas al perder todo agua residual.

***S. dentisani* cepa 7747:**

1. Optimización de los parámetros y condiciones de crecimiento a pequeña escala de *S. dentisani* de la cepa 7747

Los parámetros determinados para el correcto crecimiento de la cepa 7747 a pequeña escala son:

Temperatura	Agitación	Tiempo de Crecimiento
37 °C	60 r.p.m.	48 h

Los resultados obtenidos tras el análisis de las tres condiciones de estudio de la cepa 7747 son los siguientes:

- **pH:** Durante el crecimiento bacteriano se han tomado muestras para medirle el pH del medio y se le ha ajustado a pH entre 6-7.

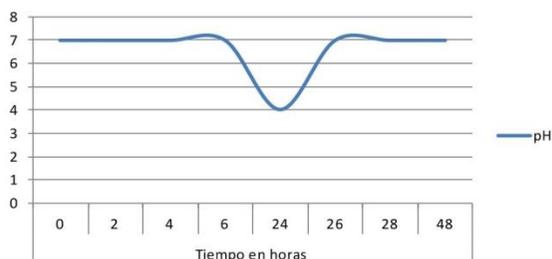
La evolución del pH a lo largo de las 48 horas de crecimiento bacteriano es:

---



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

**Evolución de pH cepa 7747**



\* A las 24 horas se ajusta la concentración de pH en el medio a 7.

Como se observa en la gráfica, el pH bajó por debajo de 5 a las 24 horas de crecimiento y se le ajustó a pH 7. A partir de ahí, el pH no varió durante las 24 horas restantes de incubación.

- **Glucosa:** Durante el crecimiento bacteriano se han tomado muestras para medir la concentración de glucosa que tenía el medio de cultivo y se le ha ajustado a 2.5 gr/l.

El resultado de la cuantificación de glucosa en el medio de cultivo a lo largo del tiempo de crecimiento bacteriano es:

**Evolución del consumo de g/l Glucosa cepa 7747**



\* A las 24 horas se ajusta la concentración de Glucosa en el medio a 2.5 gr/l

El consumo de glucosa aumenta conforme va aumentando el crecimiento bacteriano. A las 24 horas se le ajustó la concentración de glucosa y se observa no observándose un aumento de la misma sino una disminución de la concentración tras las 24 horas siguientes.

Una vez finalizadas las 48 horas de crecimiento, se les midió el crecimiento bacteriano ( $D.O_{600nm}$ ) y se sembró el último tiempo para determinar las unidades formadoras de colonia por mililitro de medio de cultivo obtenidas. Los resultados obtenidos son los siguientes:



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

Cepa	Control (sin ajustar nada)		Ajuste de pH		Ajuste de Glucosa	
	D.O. <sub>600nm</sub>	Ufc/ml	D.O. <sub>600nm</sub>	Ufc/ml	D.O. <sub>600nm</sub>	Ufc/ml
7747	0.9528	1.5 * 10 <sup>5</sup>	0.6582	1.8 * 10 <sup>7</sup>	0.6955	7.5 * 10 <sup>5</sup>

Estos datos indican que el ajuste de pH en el medio de cultivo favorece el crecimiento bacteriano, mientras que el ajuste de la concentración de glucosa no es significativo, no aumenta la tasa de crecimiento.

A las 48 horas de ser cultivada en cualquiera de las 3 condiciones la cepa muere, y no es posible volver a ser cultivada, por lo que el cultivo deberá ser parado antes de las 48 horas. Esto nos indica que la cepa podría estar secretando al medio alguna sustancia tóxica que a tiempo final termina por dañar la población bacteriana.

2. Escalado industrial del cultivo de *S. dentisani* cepa la 7747

Tras realizar dos procesos de fermentación, los parámetros de crecimiento bacteriano en el escalado industrial en un fermentador son los siguientes:

pO2%	Agitación (r.p.m.)	Temperatura	Tiempo Crecimiento
3%	100	37 °C	22 h

El tiempo de incubación de la fermentación es de 22 horas ya que a partir de este tiempo disminuye el crecimiento bacteriano y la bacteria no es viable.

Los resultados obtenidos de evolución de pH, consumo de glucosa y crecimiento bacteriano a lo largo de las 22 horas de incubación son los siguientes:

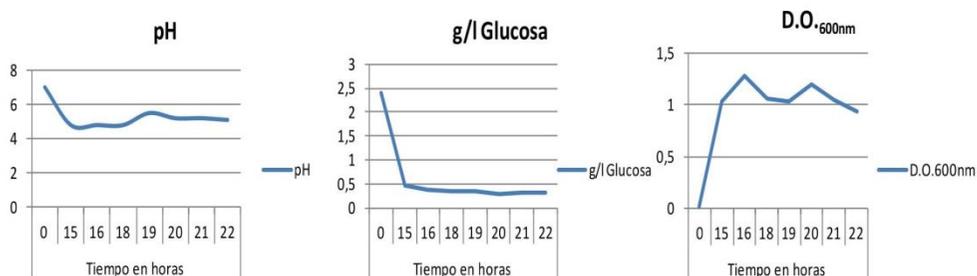
Tiempo	0 h	15 h	16 h	18 h *	19 h	20 h	21 h	22 h	gr pellet celular	ufc/gr pellet celular
pH	7,0	4,8	4,8	4,8	5,5	5,2	5,2	5,1		
Glucosa (g/l)	2,4	0,481	0,37	0,359	0,359	0,282	0,321	0,333		
D.O. <sub>600nm</sub>	0,016	1,031	1,281	1,066	1,036	1,199	1,04	0,931		

\*Ajuste de pH a 5.5



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

Si lo representamos gráficamente sería:



Estos datos lo que nos indican es:

- El **pH** fue disminuyendo durante el crecimiento bacteriano y se ajustó el pH a tiempo 18 horas.
- La **glucosa** bajó durante el crecimiento bacteriano, pero no se corrigió la concentración.
- La **D.O.** bajó a las 18 horas, y tras la corrección de pH recuperó el cultivo y continuó creciendo. La fermentación se paró a las 22 horas cuando se detectó una disminución de D.O. y por tanto de crecimiento bacteriano sin variación de pH.
- Se ha optimizado el rendimiento del escalado industrial del crecimiento de la cepa 7747 al no ajustarle la concentración de glucosa. Se ha obtenido mayor cantidad de biomasa celular y el conteo de ufc/gr es de  $4,0 * 10^9$  ufc/gr.

3. Liofilización de la biomasa celular de *S. dentisani* cepa 7747 con diferentes crioprotectores.

Tras el proceso de liofilización, los datos obtenidos de viabilidad al sembrar las unidades formadoras de colonia de cada condición, crioprotector, son los siguientes:

Crioprotector	Biomasa Fermentación Ufc/gr	Biomasa tras la liofilización (t=0h) ufc/gr
Sin Crioprotector (PBS 1x)	$4.0 * 10^9$	$1.2 * 10^8$
5% Maltodextrina		$6.0 * 10^8$
5% Inositol		$6.0 * 10^{12}$

El proceso de liofilización se ha realizado correctamente. El líofilo de cada condición se ha envasado en viales de vidrio transparente tipo I.

El resultado obtenido indica que:

- Control, Sin Crioprotector: tras la congelación y la liofilización disminuye la viabilidad.
- Maltodextrina: tras la congelación y la liofilización disminuye la viabilidad.



*Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de S. dentisani*

---

- Inositol: es el mejor crioprotector ya que la viabilidad es estable y al liofilizar la biomasa, se obtiene una tasa de crecimiento mayor debido a que las células no pierden viabilidad y están más concentradas al perder el agua residual.



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

---

## CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en base a los resultados son las siguientes:

- El crecimiento de *S. dentisani* de las cepas 7746 y 7747 requiere un aporte mínimo de oxígeno y un ajuste de pH durante el tiempo de crecimiento bacteriano.
- El aporte de una fuente de carbono como la glucosa al medio de cultivo, inhibe el crecimiento bacteriano.
- Estas cepas, 7746 y 7747, pierden viabilidad a partir de las 22 horas de crecimiento.
- El inositol al 5% es el mejor crioprotector de ambas cepas de *S. dentisani*, mantiene la viabilidad de las bacterias tras el proceso de liofilización.



Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de *S. dentisani*

---

#### ACTIVIDADES FUTURAS

Se realizarán pruebas de estabilidad acelerada ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  &  $75\% \pm 5\% \text{RH}$ ) en los liófilos obtenidos de cada cepa y crioprotector, envasados en viales de vidrio transparente tipo I, estudiando la viabilidad bacteriana durante el primer mes semanalmente.

El resultado final de viabilidad se obtendrá en la semana 46 al completar un mes del inicio del estudio de estabilidad acelerada.



*Informe sobre las pruebas piloto de fermentación, liofilización y estabilidad de S. dentisani*

---

### BALANCE ECONÓMICO DEL PROCESO

A tenor de los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de trabajo ofrecen rendimientos de 6,1  $10^{13}$  cfu para la cepa 7746 y de 6.0  $10^{12}$  cfu para la cepa de 7747 a tiempo inicial.

Según los estudios del Dr. Mira, la concentración eficaz terapéutica de *S. dentisani* es  $10^8$  cfu.

Estos resultados nos permiten definir al menos dos escenarios de trabajo para evaluar el balance económico de la puesta en el mercado de productos que contengan estas cepas de *S. dentisani*.

### Formulaciones en caramelos masticables o chicles.

Las formulaciones destinadas a la fabricación de caramelos masticables o chicles deberían contener un ingrediente base con un contenido de *S. dentisani* del 1% en la fórmula final. Esto significa que el ingrediente base ha de contener una concentración bacteriana de *S. dentisani* de  $10^{10}$  cfu, para que una vez sea formulado el producto final alcancemos valores de *S. dentisani* de  $10^8$  cfu.

El precio de mercado de un ingrediente de estas características ha de estar en torno a 400-500€/kg, por lo que el impacto del ingrediente en el producto final sería entre 4-5€/Kg de producto final.

Con los resultados obtenidos en el escalado y liofilización de las cepas obtenemos rendimientos de 6,1  $10^{13}$  cfu/gr para la cepa 7746. En las fermentaciones actuales se obtienen 16 gramos de liofilizado, lo que supone una carga de biomasa de  $9,7 \cdot 10^{14}$  cfu totales.

Con esta biomasa podemos confirmar que disponemos de capacidad suficiente como para producir 97,6 Kg de ingrediente por fermentación optimizada.

La capacidad de PROTEOS de fabricación de este tipo de producto es de unos 400 kg de ingrediente al mes. El coste medio de fabricación es de 250€-300€/kg dependiendo del excipiente empleado.

### Formulaciones en viales

En este tipo de formulación, lo deseable es disponer de viales monodosis con contenido de *S. dentisani* liofilizado. Los viales han de ser reconstituídos en 2ml de solvente de reconstitución (suero fisiológico o algún solvente más denso) que permitan obtener una disolución extemporánea con una carga bacteriana final de producto de  $10^8$  cfu.

En estas condiciones, PROTEOS posee una capacidad de producción por fermentación optimizada superaría el millón de viales.

La capacidad actual de fabricación de viales liofilizados de 3ml en PROTEOS es de 100.000 viales al mes. El precio estimado de producción por vial está entre 2-3€.



## APÉNDICE

### 2. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

---



## PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

---

"*Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group"

Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A  
*Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Jan;64(Pt 1):60-5

---



## *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group

Anny Camelo-Castillo,† Alfonso Benítez-Páez,† Pedro Belda-Ferre, Raúl Cabrera-Rubio and Alex Mira

Correspondence  
Alex Mira  
mira\_ale@gva.es

Oral Microbiome Laboratory, Genomics & Health Department – Center for Advanced Research in Public Health (CSISP-FISABIO), Valencia, Spain

Genomic, taxonomic and biochemical studies were performed on two strains of  $\alpha$ -haemolytic streptococci that showed them to be clustered with major members of the *Streptococcus mitis* group. These Gram-stain-positive strains were isolated from tooth surfaces of caries-free humans and showed the classical spherical shape of streptococcal species growing in chains. Sequence analysis from concatenated 16S and 23S rRNA gene and *sodA* genes showed that these strains belonged to the mitis group, but both of them clustered into a new phylogenetic branch. The genomes of these two isolates were sequenced, and whole-genome average nucleotide identity (ANI) demonstrated that these strains significantly differed from any streptococcal species, showing ANI values under 91 % even when compared with the phylogenetically closest species such as *Streptococcus oralis* and *S. mitis*. Biochemically, the two isolates also showed distinct metabolic features relative to closely related species, like  $\alpha$ -galactosidase activity. From the results of the present study, the name *Streptococcus dentisani* sp. nov. is proposed to accommodate these novel strains, which have been deposited in open collections at the Spanish type Culture Collection (CECT) and Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), being respectively identified as *Streptococcus dentisani* Str. 7746 (=CECT 8313=DSM 27089) and *Streptococcus dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> (=CECT 8312<sup>T</sup>=DSM 27088<sup>T</sup>).

The genus *Streptococcus* comprises a large number of species, some of them identified as human and domestic animal pathogens. Notwithstanding, species of the genus *Streptococcus* also have positive effects on human health, and some of them have started to be used as probiotics in human gut disorders (Hempel *et al.*, 2012). Nowadays, more than 70 species are classified as members of the genus *Streptococcus* but the identification of isolates is still ambiguous given the low specificity of traditional typing methods (Jensen *et al.*, 1999; Kikuchi *et al.*, 1995). In particular, identification of closely related species belonging to the mitis group of  $\alpha$ -haemolytic or viridans streptococci may prove difficult even using the classical DNA–DNA hybridization approach (Kikuchi *et al.*, 1995).

This group of streptococcal organisms are widespread in the human oral cavity and associated with healthy status (Belda-Ferre *et al.* 2012) as opposed to members of the mutans streptococci, which are known to be acidogenic and have been shown to be involved in dental caries and tooth decay (Loesche *et al.*, 1975). Given the high degree of similarity at the genetic and physiological level observed in members of the mitis group, different molecular approaches have been developed or improved in order to efficiently identify clinical isolates (Kilian *et al.*, 2008). Among them, phylogenetic studies of the 16S rRNA gene (Bentley *et al.*, 1991) are still widely used to establish genetic relationships within the genus *Streptococcus*. However, study of other molecular markers has been proposed as an alternative to 16S rRNA gene analysis or to be used in a combined fashion to improve species identification. Those markers include analysis of *rnpB* (Täpp *et al.*, 2003), *tuf* (Picard *et al.*, 2004), *rpoB* (Drancourt *et al.*, 2004) and particularly *sodA* (Poyart *et al.*, 1998) genes. Approaches to determine the sequences of such markers definitely have improved identification of streptococcal species and limitations in terms of use and cost are being rapidly overcome with next-generation sequencing approaches (Innings *et al.*, 2005). Massive and parallel sequencing has permitted investigators to obtain bacterial whole-genome sequences in few days after refined

†These authors equally contributed to this study.

**Abbreviations:** ANI, average nucleotide identity; ANIb, ANI obtained using BLAST; ANIm, ANI obtained using MUMmer.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the draft genome sequences of *Streptococcus dentisani* Str. 7746 and Str. 7747<sup>T</sup> are CAUJ01000001–CAUJ01000008 and CAUK01000001–CAUK01000006, respectively. Those for the 16S rRNA gene sequences of the two strains are HG315101 and HG1315102, respectively; those for the 23S rRNA gene sequences are HG315103 and HG315104, respectively.

A supplementary figure is available with the online version of this paper.

processing of information. Therefore, whole-genome comparisons of microbiological isolates of clinical or biotechnological relevance tend to be the best way to determine their phylogenetic position in a specific group of microorganisms, replacing classical approaches such as DNA–DNA hybridization (Konstantinidis & Tiedje, 2005a; Richter & Rosselló-Móra, 2009). As a consequence, during the present taxonomic study we have performed whole-genome sequencing of two isolates from caries-free human tooth surfaces. In this manuscript, we present phenotypic and genetic comparisons of the 16S rRNA genes, 23S rRNA genes and *sodA* genes, as well as whole-genomic-level analysis, which have led us to propose a novel species of the genus *Streptococcus*.

Supragingival dental plaque from adult individuals who had never suffered from dental caries was obtained with sterile spoon excavators from vestibular and lingual surfaces of teeth. Oral biofilm samples were resuspended in sterile Phosphate-buffered saline (0.137M NaCl, 0.003M KCl, 0.010M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.018M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5) and disaggregated by brief vortexing and repeated pipetting. Small aliquots of the cell suspension were then uniformly spread on Brain–Heart Infusion (BHI), Chocolate Blood Agar (CBA), Luria–Bertani (LB) and Tryptic Soy Broth (TSB) plates (according to DSMZ media formulae for *Streptococcus* sp. cultures; www.dsmz.de) under aerobic conditions at 37 °C. Every single colony isolated was subject to large-scale screening to detect growth inhibition of the cariogenic species *Streptococcus mutans* UA159. Two colonies isolated from different individuals were selected for further analysis given their ability to form inhibition haloes on BHI plates where *S. mutans* UA159 had been previously spread using sterile swabs. The isolates with antimicrobial activity on *S. mutans* were purified by several passes on BHI plates and were sent to the Spanish type Culture Collection (CECT) where they were stored and identified as *Streptococcus dentisani* sp. nov. Str. 7746 (=CECT 8313) and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> (=CECT 8312<sup>T</sup>). A second deposit was requested to the Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) where *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> strains were identified as DSM 27089 and DSM 27088<sup>T</sup>, respectively. The biochemical traits were determined with the API 20 Strep and API 50 CHL strips (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions. *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> strains were grown overnight on BHI plates to prepare the cell inoculum in the API suspension media with the proper optical density demanded by this procedure. In the API20 strip, first readings were obtained after 4 h of incubation at 37 °C in a humidified atmosphere, and second readings (when required) was obtained after 24 h. In the API50 CH kit, readings were obtained at 24 and 48 h after incubation. Positive and negative tests were evaluated according to the colour code indicated by the API system. For comparison purposes, *Streptococcus mitis* ATCC 49456<sup>T</sup>, *Streptococcus oralis* ATCC 35037<sup>T</sup>, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556<sup>T</sup>,

*Streptococcus salivarius* ATCC 7073<sup>T</sup> and *Streptococcus infantis* JCM 10157<sup>T</sup> were obtained from the DSMZ (Braunschweig, Germany).

Under microscopic examination after Gram staining, both *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> cells show Gram-positive staining and spherical shape, growing in short chains (two to six cells per chain). *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> formed pin-point white colonies on BHI plates at 37 °C under aerobic conditions after 48 h of incubation with a mean colony size of 1.5 mm in diameter. On Columbia Blood (CB) plates, the CECT 8313 and CECT 8312<sup>T</sup> strains showed  $\alpha$ -haemolysis after 48 h of incubation at 37 °C under aerobic conditions. After testing of different media, *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> cells grew faster in BHI media supplemented with 1% glucose at a temperature range between 34 °C to 40 °C under aerobic conditions, but normal growth was also achieved under anaerobiosis. Their optimal pH ranged between 6.0 and 7.5, and growth was achieved until this was reduced to pH 5.5. The biochemical traits for *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> and five type strains of related species were determined using two sets of commercially available reagents. Differential biochemical traits among all strains tested are listed in Table 1. On the basis of this biochemical profile, comprising a total of 56 metabolic traits, a dendrogram was obtained (Supplementary Table 1, at top) in which the *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> clustered together, in agreement with the phylogenetic and genomic analyses. At the same time both strains clustered with species of the mitis group of the genus *Streptococcus*, reinforcing their evolutionary relationship with these other oral-derived members of the genus *Streptococcus*. Notably, *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> clearly metabolize lactose like most of the other mitis streptococci, and globally they seem to be able to use several saccharides as carbon sources. Moreover, activity of  $\alpha$ -galactosidase is presented as a specific trait of *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747, a trait which was confirmed at the genetic level by detection of the corresponding gene in the *S. dentisani* genome. On the other hand, alkaline phosphatase activity is one of the metabolic traits for which *S. dentisani* resembles *S. oralis*. Although the API tests indicated inability to ferment glucose, an independent test was performed using GP medium (pH 7.8) with 1% glucose as the only carbon source, containing phenol red as a pH indicator. After 24 h, both strains of *S. dentisani* were able to ferment glucose, as indicated by a colour change.

Genomic DNA from *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> was purified from overnight cultures in BHI media by using a MasterPure DNA Extraction kit (MCD85201; Epicentre). Initially, approximately 5  $\mu$ g of genomic DNA was fragmented and subjected to single-end sequencing using a 454 GS FLX pyrosequencing instrument (Roche). Additional sequencing was performed with Titanium chemistry following the pair-ends protocol, according to the manufacturer's instructions. Poor quality

**Table 1.** Biochemical traits of *S. dentisani* sp. nov. Str. 7746 and Str. 7747<sup>T</sup>

Strains: 1, Str. 7746; 2, Str. 7747<sup>T</sup>; 3, *S. mitis* ATCC49465<sup>T</sup>; 4, *S. oralis* ATCC35037<sup>T</sup>; 5, *S. sanguinis* ATCC 10556<sup>T</sup>; 6, *S. infantis* JCM 10157<sup>T</sup>; 7, *S. salivarius* ATCC 7073<sup>T</sup>. C, trait included in the API 50 CH strip; S, trait included in the API 20 Strep strip. -, Negative reaction; +, positive reaction; (+), weakly positive reaction. Only the traits for which there are differences between the strains are included.

Trait	1	2	3	4	5	6	7
Amygdalin (C)	-	-	-	-	-	-	+
Arbutin (C)	-	-	-	-	-	-	+
Inulin (C,S)	-	-	-	-	(+)	-	-
Lactose (C,S)	+	+	+	+	(+)	+	-
Maltose (C)	-	+	+	+	+	(+)	+
Raffinose (C,S)	(+)	(+)	+	-	-	-	(+)
Ribose (C,S)	-	-	+	-	-	-	-
Starch (C,S)	-	-	-	-	-	-	(+)
Trehalose (C,S)	-	-	-	+	(+)	-	+
α-Galactosidase (S)	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Alkaline phosphatase (S)	+	(+)	-	+	-	-	-
VP-reaction (S)	-	-	-	-	-	-	+
β-Glucosidase (C,S)	-	-	-	-	(+)	-	(+)
Cellobiose (C)	-	-	-	-	-	-	+
Fructose (C)	(+)	(+)	+	+	+	+	-
Galactose (C)	-	(+)	+	+	+	+	-
Gentiobiose (C)	-	-	-	-	-	-	+
Glucose (C)*	-	-	+	+	+	+	-
Hippuric acid (S)	-	-	-	-	-	+	-
Mannose (C)	-	(+)	(+)	+	+	+	-
Methyl β-D-xylopyranoside (C)	-	-	+	+	+	+	-
Sucrose (C)	-	(+)	+	+	+	+	-

\*Although API strips gave a negative result, both strains appeared to ferment glucose in a different test after 24 h of incubation as well as the *S. salivarius* type strain. All traits are based on the use of the listed metabolites as carbon source except for those described as Hippuric acid and Alkaline phosphatase.

reads were filtered and trimmed. *De novo* genome assembly was assisted by Newbler (454 Life Sciences). Eight and six DNA scaffolds were respectively obtained for *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> with sizes between 2000 and 1 100 000 nt. Those scaffolds were submitted to the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL–EBI through its Webin platform for public access.

For further studies to clarify the relationship of *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> with closely related species such as *S. oralis* and *S. mitis* and to define their degree of identity at the DNA level, we performed average nucleotide identity (ANI) analysis (Konstantinidis & Tiedje, 2005a) through whole-genome comparisons. The ANI and ANIm values (Konstantinidis & Tiedje, 2005a), based on BLAST (Altschul *et al.*, 1990) and MUMmer (Kurtz *et al.*, 2004) comparisons, respectively, were calculated

using the JSpecies v1.2.1 application (Richter & Rosselló-Móra, 2009). For comparison, we used 65 complete and 72 draft genomes [from the Human Microbiome Project (HMP)] of species of the genus *Streptococcus* available at GenBank.

After sequencing and *de novo* assembly of *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> genomes, we obtained draft genomes of 1 981 087 nt and 1 884 389 nt, respectively. The DNA G+C content for both strains was calculated to be 40.8 mol%, being very similar to other DNA G+C content values from species belonging to the mitis group of the genus *Streptococcus* (Kawamura *et al.*, 1998). The ANIb and ANIm values resulting from

**Table 2.** Average nucleotide identity analysis between *Streptococcus dentisani* sp. nov. and species of the genus *Streptococcus* for which full sequences are available

Strains: 1, Str. 7746; 2, Str. 7747. ANIb values correspond to ANI analysis using the BLAST tool for sequence alignment whereas ANIm represent values obtained with the MUMmer tool. When several ANI values were obtained from different strains belonging to same species, the mean ANI value is reported.

Strain for comparison	ANIb (%)		ANIm (%)	
	1	2	1	2
<i>Streptococcus dentisani</i> Str. 7746	100	94	100	94
<i>Streptococcus dentisani</i> Str. 7747 <sup>T</sup>	94	100	94	100
<i>Streptococcus oralis</i>	91	91	92	92
<i>Streptococcus mitis</i>	87	87	90	90
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	86	86	88	88
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	85	85	88	88
<i>Streptococcus infantis</i>	81	81	86	86
<i>Streptococcus peroris</i>	81	81	86	86
<i>Streptococcus oligofermentans</i>	75	75	88	88
<i>Streptococcus cristatus</i>	75	75	89	89
<i>Streptococcus sanguinis</i>	75	75	87	88
<i>Streptococcus gordonii</i>	75	74	88	88
<i>Streptococcus australis</i>	74	75	87	88
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	74	74	87	87
<i>Streptococcus intermedius</i>	73	73	86	86
<i>Streptococcus constellatus</i>	73	73	86	86
<i>Streptococcus anginosus</i>	73	73	86	86
<i>Streptococcus salivarius</i>	72	72	87	86
<i>Streptococcus infantarius</i>	71	71	86	86
<i>Streptococcus suis</i>	71	71	85	85
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	71	71	85	86
<i>Streptococcus equinus</i>	71	71	86	86
<i>Streptococcus pyogenes</i>	71	70	86	86
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	71	71	86	86
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	70	70	86	86
<i>Streptococcus mutans</i>	70	70	85	85
<i>Streptococcus downei</i>	70	70	86	87
<i>Streptococcus agalactiae</i>	70	70	85	85
<i>Streptococcus uberis</i>	70	70	87	86
<i>Streptococcus equi</i>	70	70	85	85

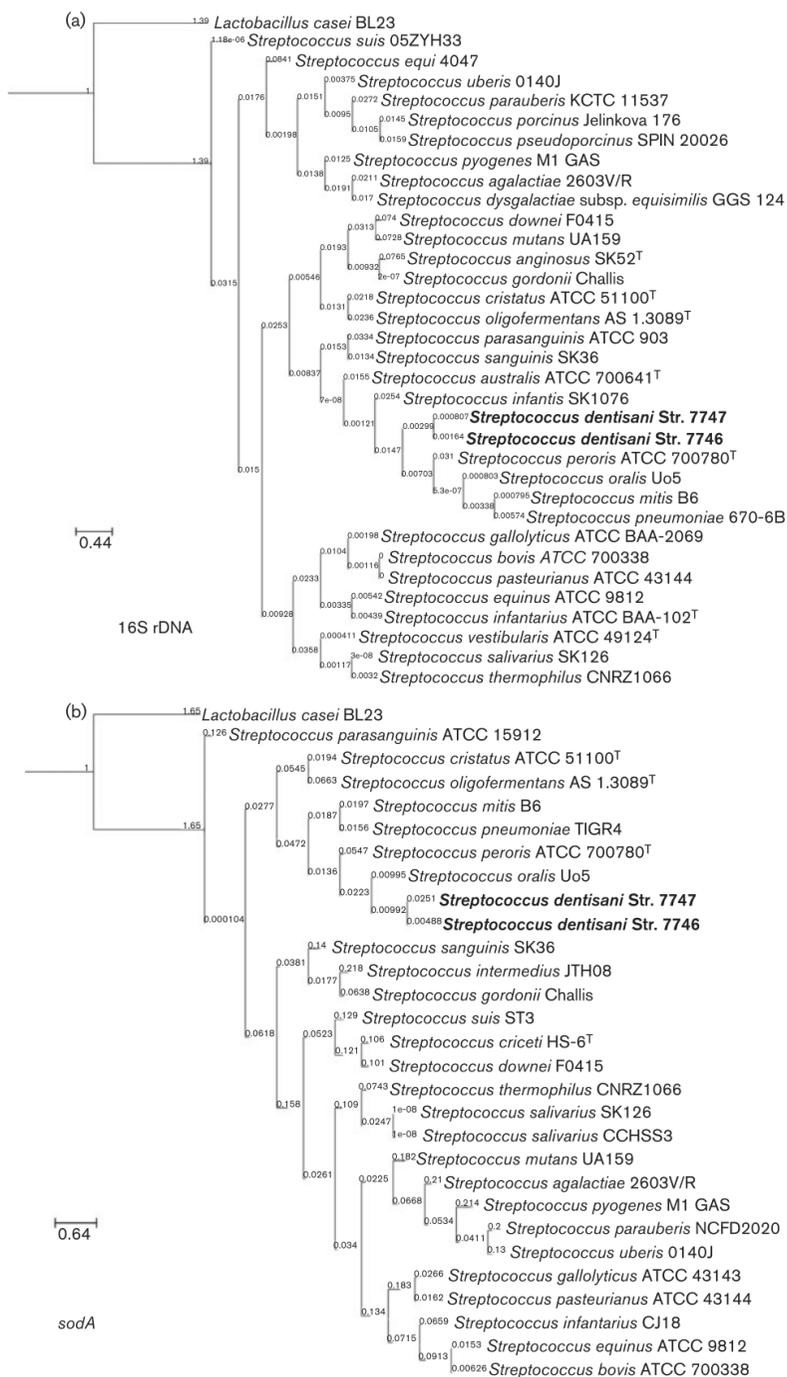
comparisons with more than 130 complete or draft genomes of species of the genus *Streptococcus* are listed in Table 2. ANI values of approximately 94–96 % have been established to represent the boundary for taxonomically circumscribing prokaryotic species (Konstantinidis & Tiedje, 2005a). Simultaneously, those values have been shown to mirror the DNA–DNA hybridization range of approximately 70 % classically adopted as the boundary for novel prokaryotic species (Goris *et al.*, 2007; Konstantinidis & Tiedje, 2005a, b; Richter & Rosselló-Móra, 2009). Globally, higher ANIb and ANIm values were obtained when *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> genomes were aligned with genomes of species belonging to the mitis group. Thus, relationships disclosed from 16S and 23S rRNAs and *sodA* genes are supported by sequence identity at genomic level among different species of the genus *Streptococcus* used for this comparative analysis. In particular, *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> showed the highest ANI values when compared to *S. oralis* (Table 2). Notwithstanding, ANI values obtained from all comparisons were well below the boundary for circumscribing novel prokaryotic species (Goris *et al.*, 2007; Richter & Rosselló-Móra, 2009), even with more conservative comparisons like that performed using the MUMmer aligner. However, *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> showed an ANI value of 94 % between each other and we therefore propose that these two oral microbial isolates here characterized are different strains of *S. dentisani* sp. nov.

The *sodA*, 16S and 23S genes were identified in the genome sequences and extracted for analysis. The FASTA-formatted DNA sequences of the Mn-dependent superoxide dismutase (*sodA*), 16S and 23S rRNA gene genes from several species of the genus *Streptococcus* were obtained from GenBank by accessing the following records: NC\_004116.1 (*Streptococcus agalactiae* 2603V/R), NC\_012891.1 (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS 124), NC\_002737.1 (*S. pyogenes* M1 GAS), NZ\_AENS00000000.1 (*S. pseudoporcinus* SPIN 20026), NZ\_AEUU00000000.2 (*S. porcinus* Jelinkova 176), NC\_012004.1 (*S. uberis* strain 0140J), NC\_015558.1 (*S. parauberis* KCTC 11537), NC\_012471.1 (*S. equi* subsp. *equi* 4047), NC\_009442.1 (*S. suis* strain 05ZYH33), NC\_015678.1 (*S. parasanguinis* ATCC 15912<sup>T</sup>), NZ\_AEQR00000000.1 (*S. australis* ATCC 700641<sup>T</sup>), NZ\_AFN01000000 (*S. infantis* SK1076), NZ\_AEVF00000000.1 (*S. peroris* ATCC 700780<sup>T</sup>), NZ\_AEEP00000000.1 (*Streptococcus* oral taxon 071 strain 73H25AP), NC\_015291.1 (*S. oralis* Uo5), NC\_003028.3 (*S. pneumoniae* TIGR4), NC\_013853.1 (*S. mitis* strain B6), NC\_009785.1 (*S. gordonii* Challis), NC\_009009.1 (*S. sanguinis* strain SK36), NZ\_AEVC00000000.1 (*S. cristatus* ATCC 51100<sup>T</sup>), NZ\_AEKN00000000.1 (*S. downei* F0415), NC\_004350.2 (*S. mutans* strain UA159), NZ\_AFIM00000000.1 (*S. anginosus* SK52<sup>T</sup>), NC\_006449.1 (*S. thermophilus* strain CNRZ1066), NZ\_ACL001000000 (*S. salivarius* SK126), NZ\_AEVI00000000.1 (*S. vestibularis* ATCC 49124<sup>T</sup>), NC\_015215.1 (*S. gallolyticus* ATCC BAA-2069), NC\_015600.1 (*S. pasteurianus* ATCC 43144), NZ\_AEEL00000000.1 (*S. bovis* ATCC 700338),

NZ\_AEVB00000000.1 (*S. equinus* ATCC 9812<sup>T</sup>), NZ\_ABJK00000000.2 (*S. infantarius* ATCC BAA-102<sup>T</sup>) and NZ\_AEUV00000000.2 (*S. criceti* HS-6). Multiple sequence alignment was performed by iterative refinement algorithms implemented in MAFFT and Probcons tools (Do *et al.*, 2005; Katoh *et al.*, 2002). The 16S and 23S rRNA gene multiple alignments were concatenated previously by a phylogenetic approach. DNA substitution models were analysed by using the hierarchical likelihood ratio test calculation after extensive substitution model testing (Guindon *et al.*, 2010; Posada, 2008; Stamatakis, 2006). The tree topology was calculated using the nearest neighbour Interchange (NNI) method and branch lengths were supported by maximum likelihood scores. Newick format trees were visualized and edited using the Python-based ETE tool (Huerta-Cepas *et al.*, 2010).

Phylogenetic position of the *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> was studied in depth by reconstructing trees based on two relevant molecular markers such as Mn-dependent superoxide dismutase gene and the 16S rRNA gene full-length sequences. After these analyses, both strains were always clustered together and separated by short genetic distances between them, indicating they could belong to a single species (Fig. 1). Simultaneously, they are also clustered with species from the mitis group of the genus *Streptococcus* such as *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae* and *S. peroris* (Fig. 1). Although close relationships are depicted at rRNA gene level (Fig. 1a), global results indicate that *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747<sup>T</sup> seem to represent a novel species of the genus *Streptococcus* very closely related to *S. oralis* and belonging to the mitis group of the oral origin viridans streptococci. Given the low degree of variability in the 16S rRNA within the mitis group, an additional tree was reconstructed with the concatenated 16S and 23S rRNA gene full-length sequences (Fig. S1, available in IJSEM Online), containing more than twice the number of informative sites. This tree showed virtually the same phylogenetic relationships, with strains 7746 and 7747<sup>T</sup> clustering together and *S. oralis*, *S. mitis*, *S. pneumoniae* and *S. peroris* as the closest relatives.

Members of the mitis group of streptococci are well known for significant intraspecific genetic diversity (Kilian *et al.*, 2008). Thus, evidence for significant coherence between strains is required for solid evidence of a novel species within the group. In this report, we show coherence at three levels: (i) phylogenetic (rRNA and *sodA* gene phylogenies show a distinct cluster with smaller branch distances in the two strains); (ii) metabolic (a dendrogram based on 56 metabolic traits places the two strains in a separate cluster from other species tested); and (iii) genomic (ANI values between the two strains indicate that they are more closely related to each other than to any other species of the genus *Streptococcus*). The existing gap observed between *S. dentisani* strains and other sequenced streptococci further proves that the strains 7746 and 7747<sup>T</sup> belong to the same species, as it is precisely this gap or discontinuity between isolates that gives support to the



**Fig. 1.** Phylogenetic placement of *S. dentisani* sp. nov. Str. 7746 and Str. 7747<sup>T</sup>. (a) Phylogeny based on the full-length 16S rRNA gene sequence. (b) Phylogeny based on sequence analysis of the Mn-dependent superoxide dismutase gene *sodA*. Values at scale bars correspond to Genetic Distances based on the number of nucleotide substitutions per site.

existence of species as biological entities (Caro-Quintero & Konstantinidis, 2012)

### Description of *Streptococcus dentisani* sp. nov.

*Streptococcus dentisani* (den.ti.sa'ni. L. masc. n. *dens* tooth; L. adj. *sanus* healthy; N.L. gen. n. *dentisani* of a healthy tooth, pertaining to caries-free humans, from whom the organisms were isolated).

Cells are non-sporulating, non-motile, Gram-stain-positive and catalase-negative cocci growing in colonies approximately 1.5 mm in diameter and growing in short chains. Facultatively anaerobic.  $\alpha$ -Haemolytic on Columbia Blood agar plates. The biochemical characteristics of the species are listed in Table 1. The G+C content of the DNA is approximately 40.8 mol%.

The type strain is Str. 7747<sup>T</sup> (=CECT 8312<sup>T</sup>=DSM 27088<sup>T</sup>). Strains were isolated from human caries-free tooth surfaces.

### References

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.

Belda-Ferre, P., Alcaraz, L. D., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M. & Mira, A. (2012). The oral metagenome in health and disease. *ISME J* 6, 46–56.

Bentley, R. W., Leigh, J. A. & Collins, M. D. (1991). Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 41, 487–494.

Caro-Quintero, A. & Konstantinidis, K. T. (2012). Bacterial species may exist, metagenomics reveal. *Environ Microbiol* 14, 347–355.

Do, C. B., Mahabhashyam, M. S., Brudno, M. & Batzoglou, S. (2005). ProbCons: probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome Res* 15, 330–340.

Drancourt, M., Roux, V., Fournier, P. E. & Raoult, D. (2004). *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol* 42, 497–504.

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 81–91.

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59, 307–321.

Hempel, S., Newberry, S. J., Maher, A. R., Wang, Z., Miles, J. N., Shanman, R., Johnsen, B. & Shekelle, P. G. (2012). Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 307, 1959–1969.

Huerta-Cepas, J., Dopazo, J. & Gabaldón, T. (2010). ETE: a python environment for tree exploration. *BMC Bioinformatics* 11, 24.

Innings, A., Krabbe, M., Ullberg, M. & Herrmann, B. (2005). Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the *rnpB* gene. *J Clin Microbiol* 43, 5983–5991.

Jensen, T., Bossen Konradsen, H. & Bruun, B. (1999). Evaluation of the Rapid ID 32 Strep system. *Clin Microbiol Infect* 5, 417–423.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30, 3059–3066.

Kawamura, Y., Hou, X. G., Todome, Y., Sultana, F., Hirose, K., Shu, S. E., Ezaki, T. & Ohkuni, H. (1998). *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 48, 921–927.

Kikuchi, K., Enari, T., Totsuka, K. & Shimizu, K. (1995). Comparison of phenotypic characteristics, DNA-DNA hybridization results, and results with a commercial rapid biochemical and enzymatic reaction system for identification of viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 33, 1215–1222.

Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L. S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H. & Sørensen, U. B. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS ONE* 3, e2683.

Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. (2005a). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2567–2572.

Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. (2005b). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol* 187, 6258–6264.

Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. & Salzberg, S. L. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5, R12.

Loesche, W. J., Rowan, J., Straffon, L. H. & Loos, P. J. (1975). Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect Immun* 11, 1252–1260.

Picard, F. J., Ke, D., Boudreau, D. K., Boissinot, M., Huletsky, A., Richard, D., Ouellette, M., Roy, P. H. & Bergeron, M. G. (2004). Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J Clin Microbiol* 42, 3686–3695.

Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253–1256.

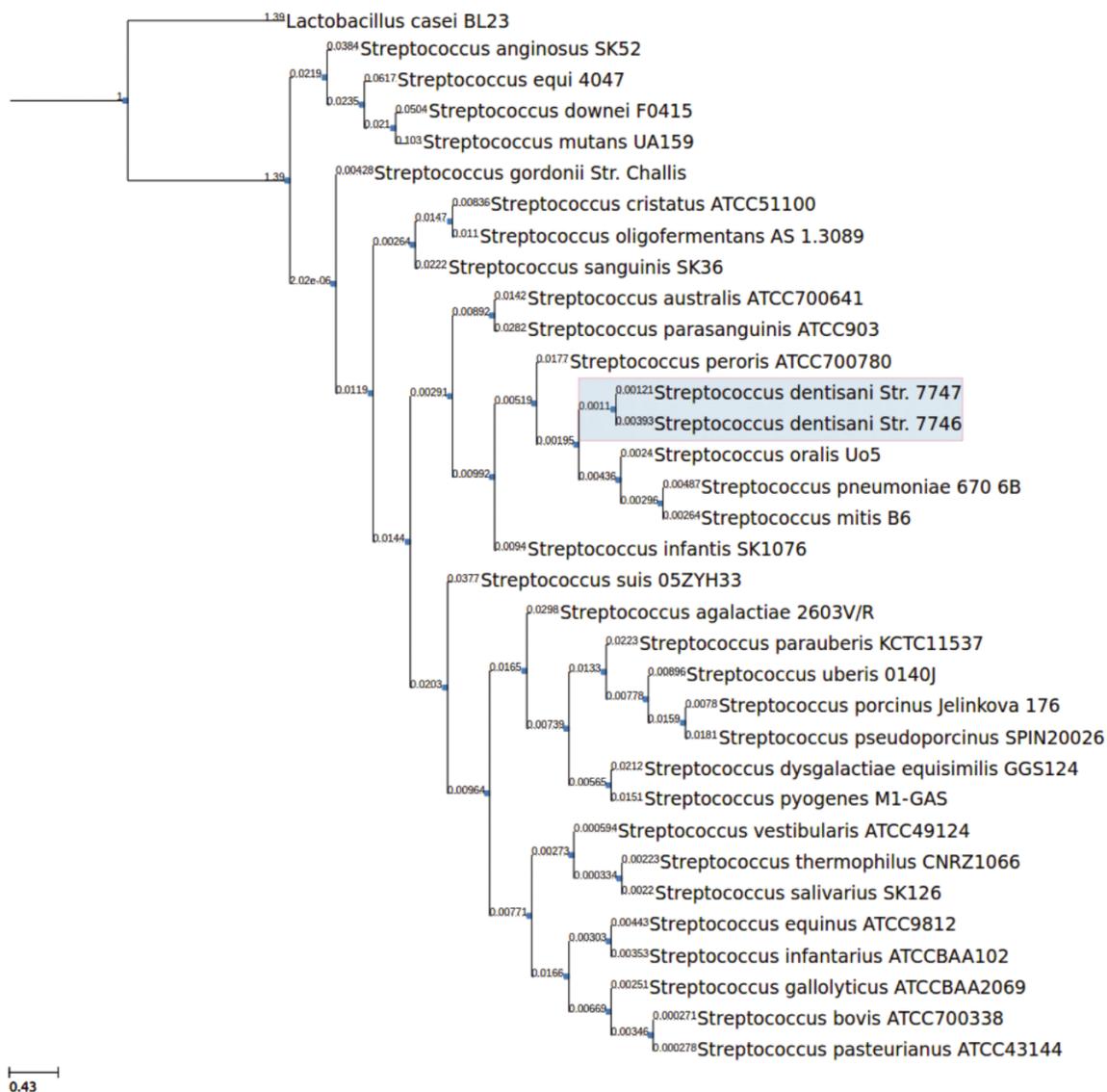
Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P. & Trieu-Cuot, P. (1998). Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol* 36, 41–47.

Richter, M. & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19126–19131.

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.

Täpp, J., Tholleson, M. & Herrmann, B. (2003). Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Streptococcus* by sequence determination of the RNase P RNA gene, *rnpB*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1861–1871.

Supplementary Figure 1. Tree Based on Concatenated 16S and 23S rRNA Genes.



Phylogenetic placement of *S. dentisani* Str. 7746 and *S. dentisani* Str. 7747 strains in a phylogenetic tree based on the concatenated full-length 16S+23S rDNA sequences. The tree topology was calculated using NNI (nearest neighbor Interchange) method and branch length is supported by Maximum Likelihood scores.



## PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

---

### "Health-Associated Niche Inhabitants as Oral Probiotics: The Case of *Streptococcus dentisani*"

López-López A, Camelo-Castillo A, Ferrer MD, Simón-Soro Á, Mira A.  
*Front Microbiol.* 2017 Mar 10;8:379

---





# Health-Associated Niche Inhabitants as Oral Probiotics: The Case of *Streptococcus dentisani*

Arantxa López-López<sup>†</sup>, Anny Camelo-Castillo<sup>†</sup>, María D. Ferrer, Áurea Simon-Soro and Alex Mira<sup>\*</sup>

Department of Health and Genomics, Center for Advanced Research in Public Health, FISABIO Foundation, Valencia, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Rebeca Martin,  
Centre de Recherches de  
Jouy-en-Josas (INRA), France

### Reviewed by:

Elaine Allan,  
University College London, UK  
Nick Stephen Jakubovics,  
Newcastle University, UK

### \*Correspondence:

Alex Mira  
mira\_ale@gva.es

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 13 September 2016

**Accepted:** 23 February 2017

**Published:** 10 March 2017

### Citation:

López-López A, Camelo-Castillo A,  
Ferrer MD, Simon-Soro Á and Mira A  
(2017) Health-Associated Niche  
Inhabitants as Oral Probiotics:  
The Case of *Streptococcus dentisani*.  
*Front. Microbiol.* 8:379.  
doi: 10.3389/fmicb.2017.00379

Oral diseases, including dental caries and periodontitis, are among the most prevalent diseases worldwide and develop as a consequence of a microbial dysbiosis. Several bacterial strains are being tested as potential oral health-promoting organisms, but usually they are species isolated from niches other than the site where they must exert its probiotic action, typically from fecal samples. We hypothesize that oral inhabitants associated to health conditions will be more effective than traditional, gut-associated probiotic species in key aspects such as colonization of the oral site where disease takes place or the possession of oral health promoting functions, as well as more practical issues like safety and toxicity, and establishing proper doses for administration. As an example of these *active colonizers*, we describe the case of *Streptococcus dentisani*, a new streptococcal species isolated from dental plaque of caries-free individuals. We have detected it in 98% of dental plaque samples from healthy individuals and, as expected, it does not produce any toxic secondary metabolite and does not survive a simulated stomach digestion, preventing potential secondary effects. Besides, this species has a double probiotic action, as it inhibits the growth of major oral pathogens through the production of bacteriocins, and also buffers acidic pH (the primary cause of dental caries) through an arginolytic pathway. We propose the use of *S. dentisani* as a promising probiotic against tooth decay.

**Keywords:** probiotics, dental caries, pH buffering, arginolytic pathway, bacteriocins, *Streptococcus dentisani*

## INTRODUCTION

Oral diseases such as dental caries (tooth decay) and periodontitis (gum disease) are caused by microorganisms. However, they are currently not considered infectious diseases in classical terms because their etiology is clearly polymicrobial (Fejerskov, 2004; Simón-Soro and Mira, 2015), and because the pathogenic bacteria involved are also found at lower proportions in healthy individuals (Hajishengallis and Lamont, 2012; Camelo-Castillo et al., 2015). Thus, it has been pointed out that antimicrobial strategies may not be effective against oral diseases, and new preventive or therapeutic approaches based on restoring the microbial ecological balance in the oral cavity have been proposed (Marsh, 2015; Marsh et al., 2015). Those new preventive measures could include the use of prebiotic compounds to promote the growth of health-associated bacteria (Santarpia et al., 2014), or the application of probiotic bacteria with beneficial features (Saha et al., 2012). In the case of dental caries, health-associated microbial communities have been identified using omics

approaches (Zaura et al., 2009; Belda-Ferre et al., 2011; Alcaraz et al., 2012), and therefore culturing those microorganisms could provide potential beneficial bacteria to prevent oral diseases.

However, due to the greater development of probiotics in gut pathologies, and the strong safety evidence accumulated for gut bacteria, many microorganisms isolated from human or animal fecal samples with beneficial properties are being developed as potential probiotics to promote oral health. These often include strains of lactobacilli and bifidobacteria, which had previously been shown to have immunomodulatory, anti-inflammatory and anti-bacterial properties in different *in vitro* studies and also in clinical trials (see **Table 1**; Reid et al., 2011; Cagetti et al., 2013). However, the use of many of these strains in oral diseases like dental caries can be problematic because both *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species have been shown to be acidogenic and to be involved in tooth decay (Badet and Thebaud, 2008; Mantzourani et al., 2009a). Even if weak acidogenic strains are selected, the capacity of gut bacteria to colonize the oral niche and to produce anti-caries effects has still to be demonstrated, and the use of gut probiotics in the oral cavity has been criticized. For instance, when the strain *Lactobacillus salivarius* W24 was tested in an *in vitro* oral biofilm model, it was shown that this strain further lowered the pH and affected the compositional stability of oral communities (Pham et al., 2009). Thus, the identification of novel strains isolated from the oral cavity itself could be instrumental for the development of efficient probiotics applied to oral health.

In the current manuscript, we describe the potential probiotic features of the new species *Streptococcus dentisani* that we recently isolated from the dental plaque of caries-free individuals (Camelo-Castillo et al., 2014). There are currently six isolates for which the genome sequence is available and that robust phylogenomic analysis include within the *dentisani* cluster (Jensen et al., 2016). This cluster forms part of the *S. oralis* clade and differs from the *S. oralis* and *S. tigurinus* clusters mainly in their ability to hydrolyze arginine (Jensen et al., 2016). In this manuscript, we study strains 7746 and 7747<sup>T</sup>, which were isolated from two different individuals and that were shown to be different by comparison of their genomes (Camelo-Castillo et al., 2014). We describe their ability to inhibit the growth of caries-producing bacteria, as *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, and to buffer extracellular acidic pH, which is the underlying cause of tooth decay. In addition, we show that, being a commensal species in the oral cavity of healthy individuals, their safety features are robust and the appropriate dose for probiotic treatment can be easily determined experimentally.

## MATERIALS AND METHODS

### Inhibition Assays with *S. dentisani* Supernatants

Inhibition experiments against cariogenic bacteria were carried out with concentrated supernatants of well grown cultures of *S. dentisani* 7746 and 7747 (stationary phase). In order to obtain 5 ml of the concentrated supernatants, single colonies of each *S. dentisani* strain were inoculated into 50 ml of brain hearth

infusion broth (BHI, Biolife) and incubated aerobically at 37°C without agitation during 48 h, or until they reached an optical density of around 1.5 at 610 nm (O.D.<sub>610</sub>). After the incubation period, the cultures were centrifuged at 4000 rpm 10 min and the pellets discarded. The obtained supernatants were filtered throughout 0.2 µm pore-size filters (Millipore) and ten-fold concentrated by rotary evaporation on a RV 10 digital device (VWR) with the following settings: heating bath at 40°C, 70 rpm of rotation, 100 mbar of pressure, and 30 min of operating time. The resulting 5 ml of concentrated supernatants were filtered throughout 0.2 µm pore-size filters (Millipore) and stored at -20°C until use.

The inhibitory activity of the supernatants was determined by monitoring the growth of *S. mutans* ATCC 25175 and *S. sobrinus* CECT 4034 in the presence/absence of the potential inhibitor by means of optical density measurements. Pre-inocula of *S. mutans* and *S. sobrinus* were obtained by inoculating a single colony of each strain in 10 ml of BHI liquid medium and incubated aerobically overnight at 37°C without agitation. The O.D.<sub>610</sub> of the pre-inocula was measured in a spectrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf) and diluted with BHI liquid medium to obtain an optical density of 0.1. To assess the inhibitory effect of *S. dentisani* on the growth of *S. mutans* and *S. sobrinus*, 160 µl of the bacterial suspensions were mixed with 40 µl of the concentrated supernatants and loaded by triplicate into a Nunc Microwell 96-well microplate by triplicate. As controls, 160 µl of the bacterial suspensions were mixed with 40 µl of 10-fold concentrated BHI and loaded by triplicate into the 96-well microplate. The microplate was loaded into a microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan) and incubated at 37°C during 24 h. The O.D.<sub>610</sub> of each inoculated well was measured every 30 min during the incubation time.

To determine the active size fraction, the concentrated supernatant was size-fractionated by sequential filtering throughout 10 kDa and 3 kDa filters (Amicon), following the manufacturer's recommendations. By this way, we obtained three size fractions (>10 kDa, 3–10 kDa, and <3kDa) that were tested by triplicate against *S. mutans* cultures by the same methodology explained above. To confirm the peptidic nature of the inhibitory compounds and discard that the inhibition was produced by hydrogen peroxide we proceed as described in Zhu and Kreth (2012). Briefly, *S. dentisani* was grown on a BHI plate for 24 h and peroxidase (40 µg), peptidase (64 µg), or phosphate-buffered saline were applied beside each colony for 10 min before the other species were inoculated at the same spot. *S. mutans* and *S. sanguinis* were used as controls of proteinaceous inhibitory substance and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively.

Besides, we used scanning electron microscopy (SEM) to directly observe the effect of the *S. dentisani* supernatants on the three type strains *S. mutans* ATCC 25175, *Prevotella intermedia* NCTC 13070, and *Fusobacterium nucleatum* DSMZ 20482 cells. Briefly, 160 µl of the bacterial cultures in exponential phase (O.D.<sub>610</sub> = 0.6) were mixed with 40 µl of the concentrated supernatant and incubated for 30, 60, and 90 min at 37°C. After the incubation period, the suspensions were centrifuged at 4000 rpm 10 min and the supernatant discarded. The pellets were fixed in 2.5% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde,

TABLE 1 | Bacteria tested in clinical trials as oral care probiotics.

Strain	Origin	Brand	Disease	Reference <sup>1</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Human intestinal tract		Caries	Aminabadi et al., 2011
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Human intestinal tract		Caries	Stecksén-Blicks et al., 2009
<i>Lactobacillus reuteri</i> 55730 + PTA 5289	Woman breast milk	Prodentis™	Ginivital health, plaque reduction and caries	Krasse et al., 2006; Caglar et al., 2008a
<i>Lactobacillus brevis</i> CD2	Dairy products	Inersan®	Periodontal disease and caries	Riccia et al., 2007; Campus et al., 2014
<i>Lactobacillus paracasei</i> SD1	Human oral cavity		Caries	Ritthagol et al., 2014
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010	Dairy products	ACTVIA®	Caries	Caglar et al., 2005
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12®	Dairy cultures	BB-12®	Caries	Caglar et al., 2008b
<i>Streptococcus salivarius</i> M18	Saliva of a healthy child	BLIS M18®	Plaque reduction	Burton et al., 2013
<i>Lactobacillus salivarius</i> WB21	Mammalian digestive tract		Gingival health, periodontal disease, halitosis and caries	Shimauchi et al., 2008; Mayanagi et al., 2009; Iwamoto et al., 2010; Suzuki et al., 2014
<i>Streptococcus oralis</i> KJ3®, <i>Streptococcus uberis</i> KJ2® and <i>Streptococcus rattus</i> JH145®	Healthy mouths	ProBiora(3)®	Caries, periodontal disease and halitosis	Zahradnik et al., 2009
<i>Weissella cibaria</i> CMU, CMS-1, CMS-2 and CMS-3	Children's saliva		Halitosis and plaque reduction	Kang et al., 2006a,b
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 + PTA 5289	Human saliva	BioGaia ProDentis	Halitosis	Keller et al., 2012
<i>Lactobacillus plantarum</i> 7481 and <i>Lactobacillus brevis</i> 7480	Children's saliva	AB:Dentis®	Halitosis and gingivitis	WO 2012022773 A1*
<i>Streptococcus salivarius</i> K12	Children's saliva	BLIS K12®	Halitosis	Burton et al., 2006
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NK1 + 100ash + K3III24	Human intestinal tract	Acilact (solely Russia)	Periodontal disease	Pozharitskaia et al., 1994
<i>Bifidobacterium bifidum</i> N1 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> NK1	Human intestinal tract	Bifidumbacterin + Acilact (solely Russia)	Periodontal disease	Grudianov et al., 2002
<i>Lactobacillus casei</i> 37	Human intestinal tract		Periodontal disease	Volzhein et al., 2004
<i>Lactobacillus paracasei</i> GMNL-33 (ADP-1)	Human oral cavity	Dental-Lac™	Periodontal disease	Chuang et al., 2011
<i>Lactobacillus salivarius</i> TI 2711 (LS 1)	Human saliva		Periodontal disease	Matsuoka et al., 2006
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (53103) + LC705	Human intestinal tract		Oral candidiasis	Hatakka et al., 2007

<sup>1</sup>Reference = Publication with results of clinical trial; \*Patent number.

washed three times with PBS buffer and exposed to 1% osmium tetroxide in PBS buffer for 1 h. The samples were rinsed with PBS buffer three more times and then moved through a gradual process of dehydration, starting with 30% ethanol and ending with absolute ethanol (multiple rinse steps at each 30, 50, 70, 80, 90, and 100% ethanol). Finally, the samples were mounted on scanning electron micrograph stubs, sputter coated with gold, and viewed on a JEOL JSM 840 scanning electron microscope.

### pH Range of Growth and Resistance of *S. dentisani* to the Digestive Process

To know the optimal and pH growth range of *S. dentisani* strains 7746 and 7747 we prepared BHI broth at different pHs (4.7, 5.5, 6, 6.5, 7, and 7.5) by adding NaOH 10 N or HCl 10 N to the commercial medium (Biolife). Pre-inocula were obtained as explained above. Two-hundred microliters of the BHI broths at different pHs were inoculated by triplicate with 20 µl of the inocula into a Nunc Microwell 96-well microplate. The O.D.<sub>610</sub> of each inoculated well was measured every 2 h

and plotted versus the time of incubation to obtain the growth curves.

To evaluate the resistance of *S. dentisani* to the digestive process, the viability of the strains 7746 and 7747 was checked after a treatment with the salivary enzyme alpha amylase, followed by digestion with gastric enzymes under progressive acidic conditions to simulate digestion, following the protocol described in Khalf et al. (2010) and Martínez et al. (2011). The assays were performed in an *in vitro* model stomach (or dynamic digester) by the external services of the Food Industry Research Association AINIA (Valencia, Spain). Each strain was tested by duplicate whereas the control was assayed once. Colony forming units (CFU) counts were obtained in BHI agar before any treatment (reference cultures), after the chewing step, and during the gastric digestion at three different times (30, 60, and 120 min). The plates were incubated at 37°C during 24–48 h. As the medium used for CFU counts was not selective for *S. dentisani*, the same assay was made without inoculation and used as blank to discount any contamination, obtaining 0 CFUs in this control.

## Growth of *S. dentisani* in an Arginine Enriched Medium

*Streptococcus dentisani* 7746 was grown in 300 ml of BHI medium amended with 5 g/l of L-arginine monohydrochloride 98% (Alfa-Aesar). The pre-inoculum was obtained by inoculating a single colony of the strain in 10 ml of BHI broth and incubating overnight at 37°C without agitation. Inoculation was made with the volume required to obtain an initial O.D.<sub>610</sub> of 0.02. For comparison, the same volume was used to inoculate 300 ml of BHI without arginine. In both conditions the initial pH was set at 7.3. The cultures were incubated at 37°C during 24 h and aliquots of 1 ml were taken every hour for measuring the pH and the O.D.<sub>610</sub>. Both conditions were assayed by triplicate.

## Prevalence of *S. dentisani* and Other Oral Probiotics in the Dental Plaque of Healthy Individuals

To assess the prevalence of *S. dentisani* in the dental plaque of healthy individuals we compared the genomic sequences of the *S. dentisani* strains 7746 and 7747 (1.98 and 1.74 Mb, respectively) against 118 metagenomes of the dental plaque of healthy individuals available at The Human Microbiome Project Consortium (HMP, Turnbaugh et al., 2007). The metagenomic reads were mapped against the sequenced reference genomes using the NUCmer and PROmer v3.06 alignment algorithms (Kurtz et al., 2004) with the default parameters, following the methodology of Belda-Ferre et al. (2011). We considered that *S. dentisani* was present in a sample if at least 20 sequences >100 bp of the metagenome showed a similarity equal to or higher than 99% with the sequenced genomes. For comparison, the same approach was used to analyze the prevalence of *S. salivarius* in dental plaque.

The presence of the genus *Lactobacillus* in different parts of the oral cavity was performed by the analysis of the oral 16S rDNA sequences deposited in the Human Microbiome Project database in year 2014<sup>1</sup>. The niches analyzed were the keratinized gingiva, buccal mucosa, hard palate, palatine tonsils, saliva, supra- and subgingival plaque, and tongue dorsum. The analyses were carried out with a total of  $4.3 \times 10^8$  sequences. The taxonomic affiliation was performed using the Megablast tool implemented in the NCBI against the SILVA ribosomal database<sup>2</sup>, with the following parameters: *e* value <1e<sup>-10</sup>, percent identity >97%, alignment length >350 bp.

## Quantification of *S. dentisani* in the Dental Plaque of Healthy Individuals

Two healthy volunteers, named MG01 and MG02, were selected for sampling. They were males aged 20–30 years, non-smokers, with 28 teeth excluding third molars, with good dental and periodontal health: in both, absence of caries (non-cavitated level), DMF = 0, OHI = 0, GI = 1, and CPI = 1 (following nomenclature by World Health Organization

[WHO], 1997). They had not been treated with antibiotics in the 6 months prior to the study nor presented antecedents of routine use of oral antiseptics. The two donors signed a written informed consent and the sampling procedure was approved by the Ethics Committee from the DGSP-CSISP (Valencian Health Authority), with reference 10/11/2009. Supragingival and subgingival dental plaque samples were taken from vestibular (buccal) and lingual (palatine) surfaces of 28 teeth in each volunteer. *Streptococcus dentisani* was quantified in individual free surfaces of each tooth type (incisor, canine, premolar, and molar) from one quadrant and the absolute numbers calculated by multiplying the obtained value by the number of each tooth type in the mouth. The same procedure was followed for the total bacterial content quantification.

Dental plaque samples were resuspended in 100 µl of PBS buffer and DNA was extracted with the MagnaPure LC JE379 instrument and the MagnaPure LC DNA Isolation Kit (Roche). The quantification of the DNA was done with the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen), and real-time PCR was performed in a LightCycler 480 System with the LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche). In every step, we followed the manufacturer's recommendations.

The specific primers used for the quantification of *S. dentisani* were designed for this study and targeted the genes for the carbamate kinase (*arcC*): CkSdF 5'-GTAAC CAACCGCCCAGAAGG-3' and CkSdR 5'-CCGCTTTCGGA CTCGATCA-3'; and the ORF540F: Orf540F (5'-ATGTTCA TCGGCTTGACAGGCTT-3') and Orf540R (5'- TAAAGCA GCATAGAACCGCGCC-3'). Primers specificity was predicted *in silico* by the primerBLAST tool implemented in the NCBI<sup>3</sup> and confirmed by absence of amplification by qPCR with 5 ng/µl DNA from *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. pneumoniae*, *S. infantis*, and *S. oralis*. The specificity of the primers was also checked by scrutinizing the melting profiles after every assay. Primers for the Ck gene did not amplify any of the tested streptococcal species. Primers for the ORF540 amplified only the DNA of *S. pneumoniae*, which is a rare inhabitant of dental plaque. Amplification was performed in a 20 µl final volume containing 1 µl of template DNA (at concentrations 5–22 ng/µl), 10 µl of the LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix, 0.4 µl of each primer, and 7.2 µl of nuclease-free water. The thermocycling protocol used was as follows: an initial step of 95°C for 5 min, and 40 cycles of 10 s at 95°C, 20 s at 65°C, and 25 s at 72°C. All the quantifications were made by duplicate.

The concentration of *S. dentisani* in each sample was calculated by comparison with the Cq values obtained from a standard curve. This was generated using serial 10-fold dilutions of DNA extracted from  $2 \times 10^7$  CFUs/ml (counted by serial dilutions in agar plates). Finally, the Cq values obtained with the plaque samples were replaced in the standard equation and expressed in absolute numbers per tooth type analyzed.

## RESULTS

### Inhibitory Activity of the *S. dentisani* Supernatants

As shown in **Figure 1A**, the addition of the *S. dentisani* 7746 concentrated supernatant produced a marked inhibitory effect on the growth of both *S. mutans* and *S. sobrinus*, as compared to the curves obtained when only concentrated BHI was added. Similarly, the concentrated supernatant completely inhibited the growth of other *S. mutans* strains (strains OMZ175 and ATCC 700610, data not shown). Regarding the curves obtained with the different size fractions, the <3 KDa fraction retained the inhibitory activity when tested against *S. mutans* ATCC 25175, while the 3–10 KDa and >10 KDa fractions did not (**Figure 1B**). The last two even enhanced the growth of *S. mutans*, probably due to a higher availability of nutrients coming from the concentrated culture medium and/or the *S. dentisani* metabolism. The same results were obtained with strain 7747 (data not shown).

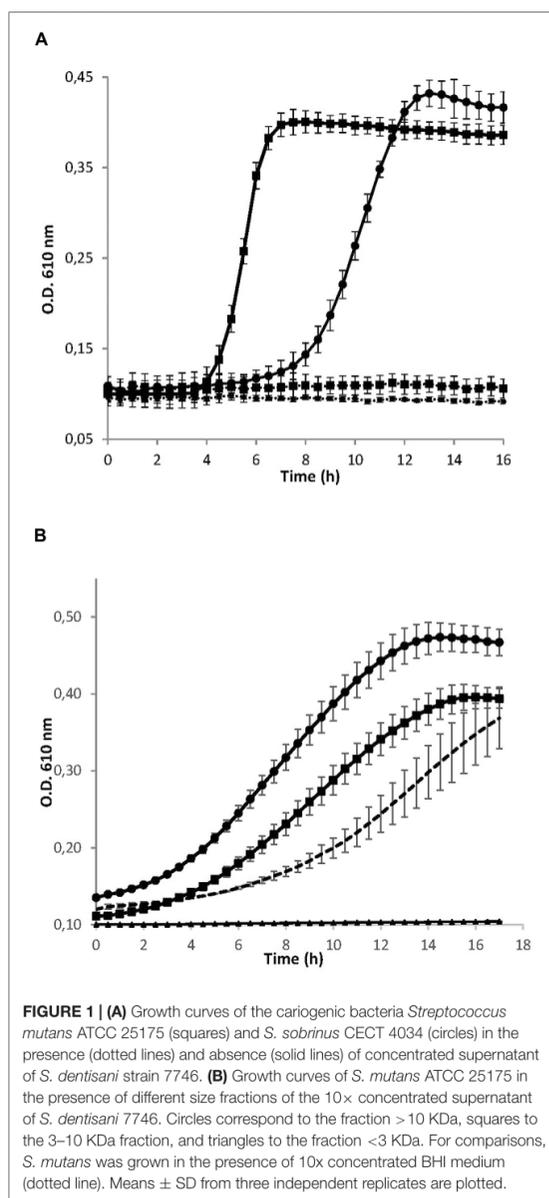
Microscopy visualizations revealed that after 30 min of incubation with concentrated supernatants of *S. dentisani*, the cells of *S. mutans*, *F. nucleatum*, and *P. intermedia* were clearly affected, showing pores in the surface of the cells (*S. mutans*), changes in the cell walls' structure (*P. intermedia*) and cell lysis (*F. nucleatum*) (**Figures 2A–C**).

Proteinase treatment of the supernatant provoked the absence of growth inhibition when tested against *S. mutans*, while the peroxidase treatment did not affect the inhibitory activity (**Figure 3**). Taken together, the results indicated that the inhibition is not due to the production of hydrogen peroxide, and supports the idea that *S. dentisani* inhibit oral pathogenic bacteria by the production of inhibitors of peptidic nature, such as bacteriocin-like peptides.

### pH Tolerance and Resistance of *S. dentisani* to the Digestive Process

*Streptococcus dentisani* was tested for its ability to grow at different pHs. The growth curves obtained showed that both strains displayed a very similar behavior, with an optimal growth pH close to 7 (**Supplementary Figures S1A,B**). It is noteworthy that they were able to grow at pH values between 6 and 7.5 but not between 4.7 and 5.5, indicating that *S. dentisani* can endure moderately acidic conditions but is not an acidophilic organism. Surprisingly, the growth of both strains at pH 6 was better than at 6.5, suggesting the activation of a buffering metabolic pathway at pH values around 6 (see Section “pH Buffering Capacity of *S. dentisani*” below).

Regarding the simulated digestive process, and as expected from the pH curves obtained before, *S. dentisani* was not able to maintain the initial viability during digestion simulations. As starting values of viability we obtained  $6.5 \times 10^8$  and  $3.9 \times 10^8$  CFUs/ml for the strains 7746 and 7747, respectively. After the chewing simulation with salivary enzymes these values decreased in only two to three orders of magnitude, showing that both strains could remain in the mouth at high levels after chewing, whereas the gastric digestion strongly inhibited their growth,

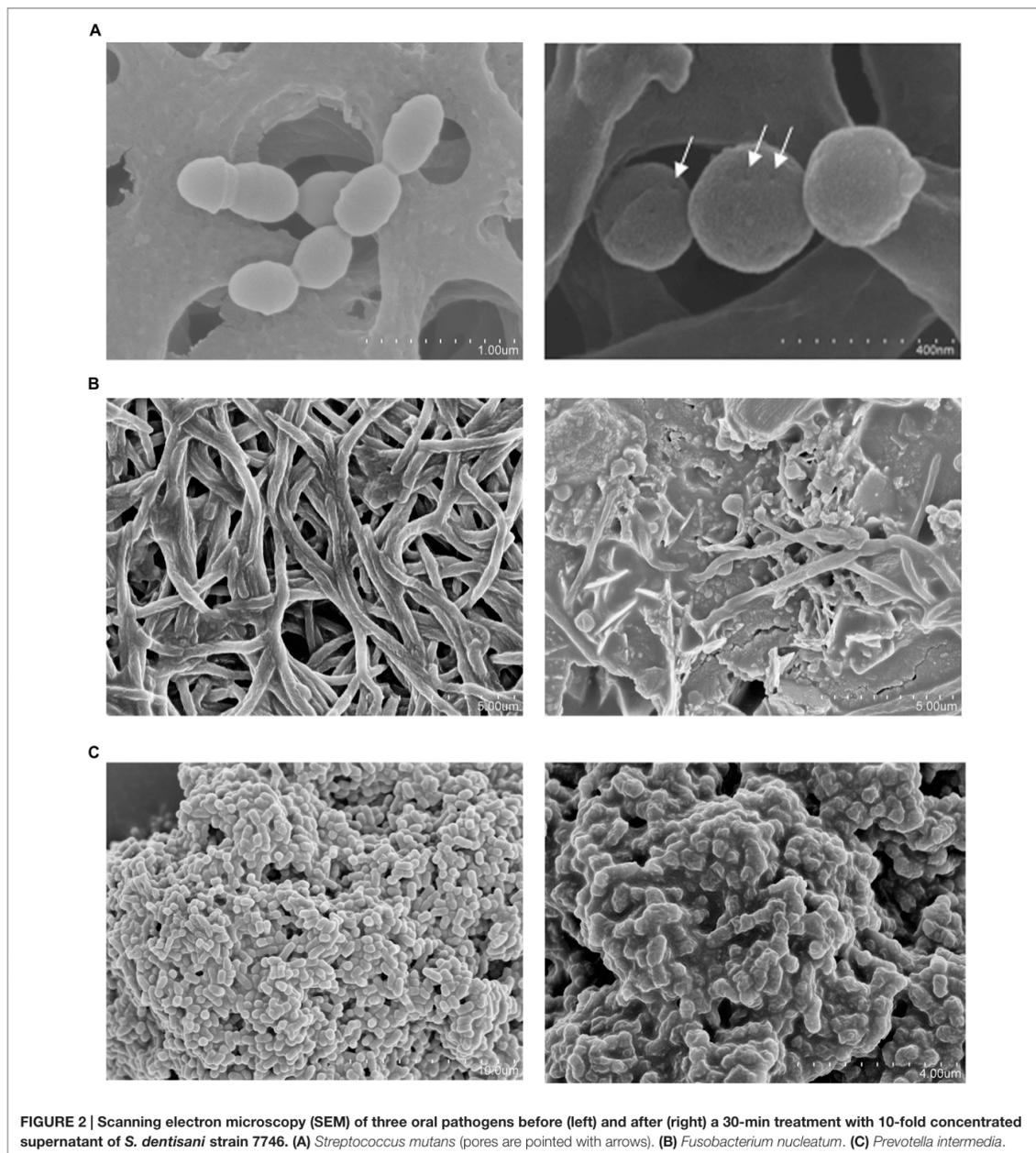


**FIGURE 1 | (A)** Growth curves of the cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (squares) and *S. sobrinus* CECT 4034 (circles) in the presence (dotted lines) and absence (solid lines) of concentrated supernatant of *S. dentisani* strain 7746. **(B)** Growth curves of *S. mutans* ATCC 25175 in the presence of different size fractions of the 10x concentrated supernatant of *S. dentisani* 7746. Circles correspond to the fraction >10 KDa, squares to the 3–10 KDa fraction, and triangles to the fraction <3 KDa. For comparisons, *S. mutans* was grown in the presence of 10x concentrated BHI medium (dotted line). Means  $\pm$  SD from three independent replicates are plotted.

even after the first step of the simulation (30 min, see **Table 2**). As neither strain of *S. dentisani* survived the gastric process, the simulation of an intestinal digestion was not performed.

### pH Buffering Capacity of *S. dentisani*

**Figure 4** depict the growth curves obtained by triplicate when *S. dentisani* 7746 was grown in presence/absence of arginine. During the initial 6 h of incubation, the growth seemed to be fueled by the sugars present in the BHI medium, as the growth

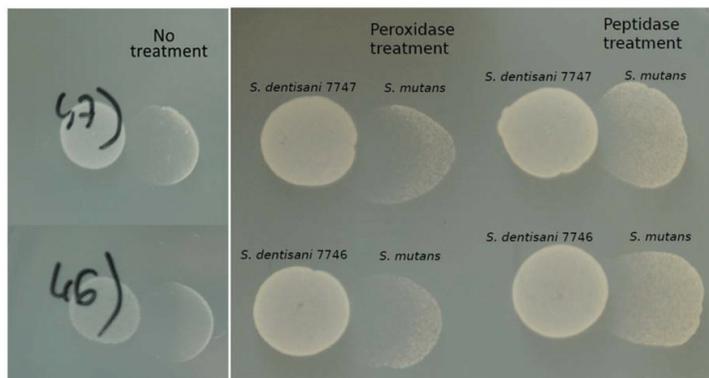


**FIGURE 2 |** Scanning electron microscopy (SEM) of three oral pathogens before (left) and after (right) a 30-min treatment with 10-fold concentrated supernatant of *S. dentisani* strain 7746. (A) *Streptococcus mutans* (pores are pointed with arrows). (B) *Fusobacterium nucleatum*. (C) *Prevotella intermedia*.

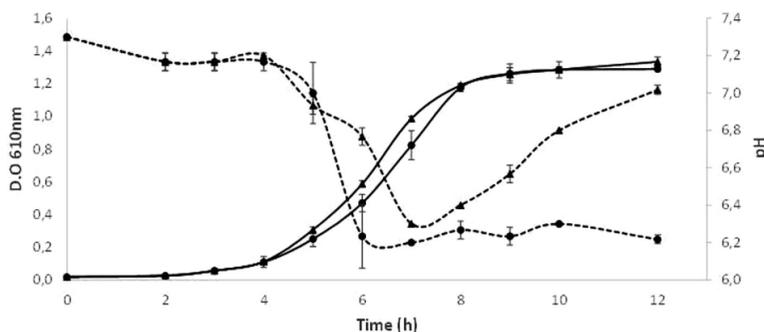
curves were identical in both conditions (with and without arginine), and the culture pH dropped from 7.3 to about 6.2. Soon after completion of this first phase, in the cultures containing arginine the pH starts to rise, reaching almost the initial pH value 12 h after inoculation. Contrarily, in the medium without arginine the pH continuously decreased to reach a value of about 6.2. In both conditions the O.D.<sub>610</sub> measurements were

similar, with a maximum value of around 1.3 after 12 h of incubation.

The analysis of the genome of *S. dentisani* showed that strains 7746 and 7747<sup>T</sup> contain the key genes of the arginine deiminase system: *arcA* (arginine deiminase, locus tag HK29\_RS02275), *arcC* (carbamate kinase, locus tag HK29\_RS02285), and *arcB* (ornithine carbamoyltransferase, locus tag HK29\_RS02280),



**FIGURE 3 | Inhibition of *S. mutans* by *S. dentisani* in the presence of peroxidase and proteinase.** The tests were performed with *S. dentisani* strains 7746 and 7747, treating with the enzymes the spots where *S. mutans* would later be grown. The controls on the left panel show the inhibition without treatment.



**FIGURE 4 | Growth curves of *S. dentisani* strain 7746 in a medium with (triangles) and without (circles) the addition of 5 g/l of arginine.** The mean  $\pm$  SD of O.D.  $_{610}$  (solid lines) and pH of the culture (dotted lines) from three replicates are depicted.

involved in the ammonia generation through arginine metabolism, a mechanism that releases ammonia extracellularly producing the alkalization of the environment (Liu et al., 2008, 2012).

### Prevalence of *S. dentisani* in the Dental Plaque of Healthy Individuals

The recruitment analyses showed that sequences of *S. dentisani* were present in most of the analyzed metagenomes (direct, whole-sequenced DNA coming from dental plaques of healthy individuals at the Human Microbiome Project). At least 20 metagenomic sequences >100 bp were found to have a similarity  $\geq 99\%$  compared with the 7746 genome in 116 out of 118 individuals, and in the strain 7747 this threshold was fulfilled in all 118 individuals. Contrarily, the species *S. salivarius* that has been proposed as a probiotic agent against caries was only detected in three of these metagenomes, in agreement with this species inhabiting mucosal surfaces and not the hard tissues. In addition, we have analyzed the *Lactobacillus* 16S rRNA gene sequences from oral samples contained in the HMP database,

as this genus contains species commonly used as oral probiotics (namely *L. acidophilus*, *L. reuteri*, and *L. rhamnosus*). The results showed that *Lactobacillus* spp. is present in very low numbers in the oral cavity, accounting for less than 0.05% of the bacterial genera in the buccal mucosa, hard palate, palatine tonsils, saliva, tongue, and supragingival plaque. The highest numbers of *Lactobacillus* 16S rDNA sequences were obtained in the subgingival plaque, but even here this genus accounted for only 0.94% of the total bacterial population. We analyzed in the same oral niches the prevalence of the genus *Streptococcus*, which was found to be present at very high numbers in the keratinized gingiva, buccal mucosa, hard palate, palatine tonsil, tongue dorsum, and saliva (59.5, 58.8, 54, 27.1, 26.8, and 19.7 per cent of the total bacterial members, respectively). Furthermore, the percentage of the genus *Streptococcus* in the subgingival and supragingival plaques was high (18.8 and 20.2%, respectively). Overall, the results showed that the genus *Streptococcus* is much more abundant than *Lactobacillus* in every analyzed oral niche, and particularly in those directly affected by the cariogenic processes, being *Streptococcus* between 20 and 600 times more

**TABLE 2 | Viability, expressed in CFU/ml, of the two strains of *S. dentisani* after the chewing and gastric digestion processes (G.D.) at three different times.**

Strain	Starting culture	Chewing pH 6.9	G.D. 30 min pH 3	G.D. 60 min pH 2.1	G.D. 120 min pH 1.7
<i>S. dentisani</i> 7746	$6.5 \times 10^8 \pm 3.05 \times 10^8$	$5.3 \times 10^6 \pm 2.8 \times 10^6$	<10	<10	<10
<i>S. dentisani</i> 7747	$3.9 \times 10^8 \pm 4 \times 10^7$	$1 \times 10^6 \pm 9.8 \times 10^5$	<10	<10	<10

The values shown are the mean of two independent replicates and the standard deviation is specified.

**TABLE 3 | Total cell counts of *S. dentisani* on supragingival dental plaque in the vestibular (V) and lingual (L) parts of different tooth types in two caries-free individuals (MG01 and MG02).**

	Incisor	Canine	Premolar	Molar
<b>MG01 (V)</b>	$2.1 \times 10^5/2.8 \times 10^4$	$4.7 \times 10^5/7.9 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5/3.46 \times 10^4$	$3.1 \times 10^5/3.1 \times 10^4$
<b>(L)</b>	$2.8 \times 10^5/2.7 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5/4.1 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5/9.8 \times 10^6$	$4.3 \times 10^5/6.9 \times 10^4$
<b>MG02 (V)</b>	$5.5 \times 10^2/7.5 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3/4.4 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3/1.3 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4/4.5 \times 10^4$
<b>(L)</b>	$3.4 \times 10^4/5.1 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4/5.9 \times 10^3$	$7.1 \times 10^4/5.0 \times 10^5$	$4.7 \times 10^4/1.7 \times 10^7$

Data show the estimates of bacterial numbers obtained by qPCR with two different sets of *S. dentisani*-specific primers (orf540/CK).

abundant than *Lactobacillus* in the subgingival and supragingival plaque, respectively.

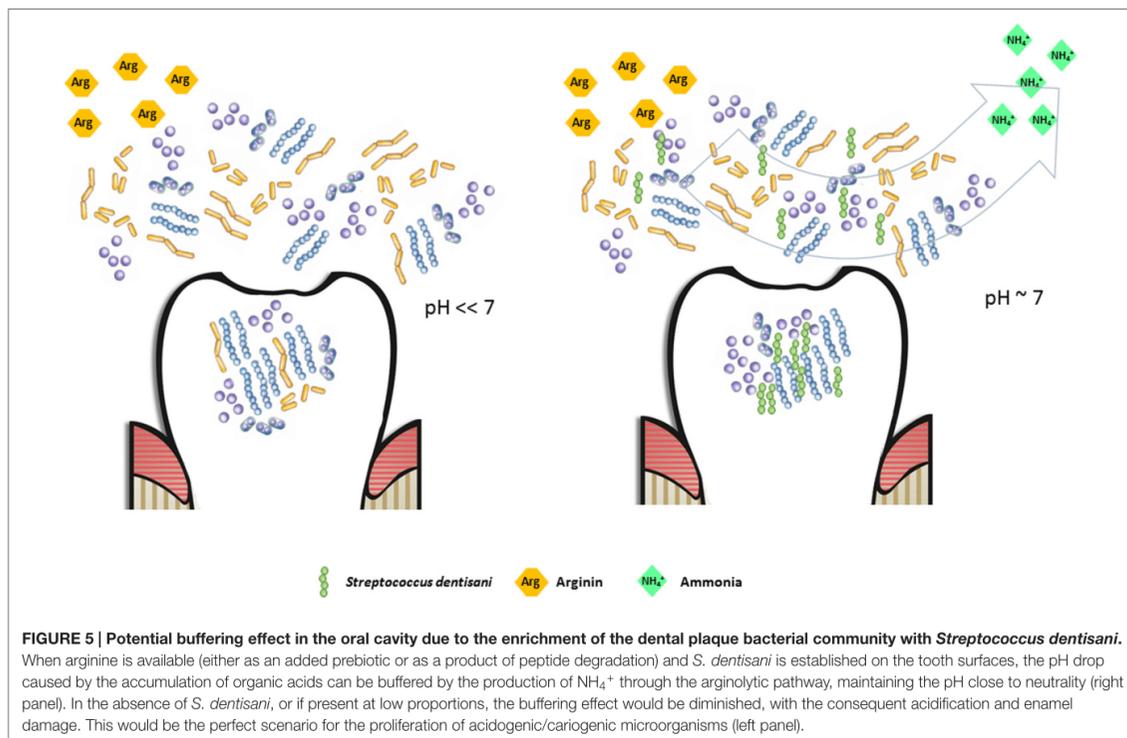
### Quantification of *S. dentisani* in the Dental Plaque of Healthy Individuals by q-PCR

The absolute numbers of *S. dentisani* cells were obtained for the teeth's free surfaces of two healthy volunteers by the use of two set of *S. dentisani*-specific primers, which provided similar estimates (Table 3). The results showed that both individuals contain very similar values of abundance of *S. dentisani* ( $1.04 \times 10^7$  and  $3.14 \times 10^7$  cells for MG01 and MG02, respectively, as estimated by the ORF540 primers;  $4.46 \times 10^7$  and  $6.94 \times 10^7$  cells for MG01 and MG02, as estimated by the carbamate kinase primers). However, although the calculated *S. dentisani* numbers in the mouth of both individuals was highly similar, its distribution was very different. As shown in Table 3, MG01 did not show important differences in the amounts of *S. dentisani* between tooth types nor between the lingual and vestibular surfaces. Patient MG02 however, had a more heterogeneous distribution, with higher proportions of *S. dentisani* in premolars and molars, and on the lingual surfaces of every tooth type.

## DISCUSSION

Dental caries is considered the most prevalent disease worldwide, with up to 80% of the human population being affected at some point during their lives (Petersen and Lennon, 2004). There are however no efficient means to prevent it, as the polymicrobial nature of the infection and its complex etiology make passive and active immunization strategies (e.g., a caries vaccine) ineffective (Fejerskov, 2004; Simón-Soro and Mira, 2015). Thus, new strategies directed towards the re-establishment of the natural balance in the oral microbiome like the use of pre- and probiotics have been proposed (Marsh et al., 2015). However, as shown in Table 1, most of the probiotics proposed to promote oral health are bacteria isolated from environments

other than the oral cavity, usually the human gut (Cagetti et al., 2013). In addition, the most commonly used probiotic bacteria to treat dental caries are lactobacilli, due to their well-proven safety characteristics. However, the use of non-oral bacteria may prevent efficient colonization of the oral niche, which is a vital and desirable feature of probiotics. This is supported by the low frequencies of lactobacilli detected in tooth tissues by molecular methods, as reported in the current manuscript. In addition, lactobacilli are important acid-producers and long known to be associated to dental caries lesions (Badet and Thebaud, 2008; Plonka et al., 2012), as well as bifidobacteria (Mantzourani et al., 2009b; Beighton et al., 2010), which are also common oral probiotics. This can be the reason why *in vitro* experiments with these bacteria, even if low-acid producing strains are selected, may result in pH acidification (Pham et al., 2009). These results underline the need to use potential probiotics from the oral cavity, and therefore the isolation of a bacteriocin-producing probiotic *Streptococcus salivarius* which inhibited the cariogenic agent *S. mutans* was promising (Wu et al., 2015). However, the comparison of the *S. salivarius* genome against a high number of metagenomes from supragingival plaque presented in the current manuscript reveals its absence in the tooth, in agreement with its soft-tissues-associated nature. *Streptococcus salivarius* is a typical inhabitant of the buccal epithelium, tongue, and dorsal epithelium (Bowden et al., 1979; Power et al., 2008) and comprises an important part of the total cultivable flora on the soft tissues of the mouth (Wilson, 2005). Probably for this reason, it has been proposed as a probiotic for the pharyngeal mucosa (Guglielmetti et al., 2010) but its inability to colonize the tooth surface may hamper its potential as an anti-caries probiotic. The high heterogeneity of environments in the mouth and the resulting adaptation of microorganisms to those specific microniches (Simon-Soro et al., 2013) underscores the importance of selecting oral bacteria adapted to live in hard tissues as probiotics against dental caries to guarantee a proper colonization. In agreement with this view, our data show that *Streptococcus dentisani*, which was isolated from supragingival dental plaque of caries-free



individuals (Belda-Ferre et al., 2011; Camelo-Castillo et al., 2014), was widespread among dental plaque samples from healthy subjects.

Apart from dental colonization, we show that an important probiotic feature of *S. dentisani* is its anti-microbial properties, inhibiting the growth of important oral pathogens like *S. mutans*, *S. sobrinus*, or *Prevotella intermedia*. In addition, the killing of *Fusobacterium nucleatum* is unusual among oral probiotics and may provide an important beneficial effect, as this organism is responsible for a large number of co-aggregation patterns with many oral species and is considered the main “bridge” bacteria between early and late colonizers of dental plaque (Kolenbrander et al., 2002). Thus, its inhibition could contribute to impede the adhesion of pathogenic organisms that co-aggregate with this bacterium and by doing so hamper dental plaque development, whose maturity has been shown to considerably increase the drop in pH after a meal (Firestone et al., 1987). In addition, *F. nucleatum* itself has been associated with halitosis due to the production of volatile sulfur compounds (Krespi et al., 2006), and therefore its growth inhibition should be investigated in the future as a way to diminish the severity of this condition.

The different experiments performed in the current work suggest a peptidic nature of the inhibitory molecules, as the inhibitory effect was significantly reduced by proteinase treatment but was unaffected by peroxidase, indicating that the inhibition was not due to the production of hydrogen peroxide

as it is common in other streptococci (Zhu and Kreth, 2012). This, together with the small size of the molecules responsible for the inhibition (<3 KDa) and the appearance of pores in the membrane of sensitive bacteria as identified by SEM, strongly suggest that the inhibition is caused by bacteriocins, and future work should be directed towards identifying and characterizing such antimicrobial peptides.

Dental caries, as well as other oral diseases like periodontitis or halitosis are not considered typical infectious diseases in classical terms, as there is more than one species responsible for their etiology, the microbial consortia causing the disease varies considerably between individuals and even between lesions of the same patient, and pathogenic organisms normally can be isolated also from healthy individuals (Hajishengallis and Lamont, 2012; Simon-Soro et al., 2014; Camelo-Castillo et al., 2015; Marsh et al., 2015; Simón-Soro and Mira, 2015). For these reasons, antimicrobial properties of probiotics may not be sufficient for effectively preventing dental caries (ten Cate and Zaura, 2012) and the ability to restore the microbial ecological balance after pH acidification, for instance by alkali production, is a promising probiotic feature (Huang et al., 2015). Production of ammonia from urea or arginine by several oral bacteria has been shown to efficiently buffer salivary pH and has been associated to a reduction in caries risk (Reyes et al., 2014; Moncada et al., 2015). The analysis of the genome of *Streptococcus dentisani* revealed all genes from the arginolytic pathway, including the arginine deiminase and the carbamate kinase, a feature which appears

to be common to all members of the cluster (Jensen et al., 2016). In addition, the agmatine deiminase gene, involved in the production of ammonia (Liu et al., 2012) was also present in both analyzed strains. In agreement with this, our data show that *S. dentisani* was able to efficiently buffer extracellular pH in the presence of arginine. Arginine is present in saliva in variable concentrations and it has also been added as a prebiotic to toothpaste, with strong clinical evidence for reducing enamel demineralization and buffering acidic pH (Yin et al., 2013; Santarpia et al., 2014). In addition, we have found in the genome of *S. dentisani* genes encoding for different aminopeptidases that can liberate arginine from peptides and proteins (Gonzales and Robert-Baudouy, 1996), which could then enter the arginolytic pathway. This is supported by the higher growth of the bacterium at pH 6 than at pH 6.5 in standard BHI growth medium (Supplementary Figure S1). Given that its optimal growth pH is neutral, and that the arginolytic pathway has been shown to be activated by low pH in other species (Liu et al., 2008), the higher growth rates at pH 6 are probably the result of protein degradation liberating arginine, which would allow the production of NH<sub>4</sub>, as well as the production of ATP derived from this metabolic route. These results also suggest that the full activation of the arginine degradation genes occurs at pH < 6.5, and the regulation of this pathway should be studied in the future. In Figure 5, we have illustrated the buffering effect that could take place in the oral cavity due to the enrichment of the dental plaque bacterial community with *S. dentisani*. When acidification occurs as a consequence of the consumption of dietary carbohydrates, and the pH drops to values around 6, *S. dentisani* would be able to activate the ADS system producing ammonia and, consequently, buffering the pH of its close environment.

The double beneficial action of *S. dentisani* (i.e., anti-microbial and anti-acid) makes it a promising probiotic bacterium. These benefits, together with its dental colonization capacity, derive to a big extent from its oral inhabitation. In addition, the choice of a dental plaque species as probiotic allows the quantification of the species in caries-free individuals, in order to use those levels as the appropriate administration dose, instead of using the dosages normally delivered for gut probiotics. In the current manuscript, we have quantified *S. dentisani* amounts in dental plaque for

just two individuals and similar estimates for larger sample sizes could serve to accurately determine the dosage for an appropriate treatment.

For all these reasons, we propose the use of probiotics which are *active colonizers*, that is microorganisms which inhabit the site where the disease takes place, and that are isolated from healthy individuals. We believe that the administration of these organisms will maximize the chance of colonization and the potential beneficial effects for human and animal health. In the case of dental caries, we encourage the search of probiotic bacteria that are normal inhabitants of the human supragingival plaque in healthy individuals and propose the use of *S. dentisani* in clinical trials to test its potential in promoting oral health.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM conceived the work, was implied in the analyses and interpretation of data and wrote the manuscript together with AL-L. AL-L, AC-C, and MF worked in the designing and performance of the experiments, data acquisition, analyses, and interpretation of the results. AS-S collected the plaque samples and made the bioinformatic analyses.

## ACKNOWLEDGMENT

The research leading to these results has received funding from the Spanish Government under grant agreements BIO2012-40007 and CSD2009-0006.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00379/full#supplementary-material>

**FIGURE S1 | Growth curves of *Streptococcus dentisani* strains 7746 (A) and 7747 (B) in BHI medium at different starting pHs: 4.7 (red), 5.5 (orange), 6 (yellow), 6.5 (light blue), 7 (dark blue), and 7.5 (purple).**

## REFERENCES

- Alcaraz, L. D., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M., et al. (2012). Identifying a healthy oral microbiome through metagenomics. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 54–57. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03857.x
- Aminabadi, N. A., Erfanparast, L., Ebrahimi, A., and Oskoue, S. G. (2011). Effect of chlorhexidine pretreatment on the stability of salivary lactobacilli probiotic in six- to twelve-year-old children: a randomized controlled trial. *Caries Res.* 45, 148–154. doi: 10.1159/000325741
- Badet, C., and Thebaud, N. B. (2008). Ecology of Lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol. J.* 2, 38–48. doi: 10.2174/1874285800802010038
- Beighton, D., Al-Haboubi, M., Mantzourani, M., Gilbert, S. C., Clark, D., Zoitopoulos, L., et al. (2010). Oral Bifidobacteria: caries-associated bacteria in older adults. *J. Dent. Res.* 89, 970–974. doi: 10.1177/0022034510369319
- Belda-Ferre, P., Alcaraz, L. D., Cabrera, R., Simon-Soro, A., Romero, H., Pignatelli, M., et al. (2011). The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 6, 46–56. doi: 10.1038/ismej.2011.85
- Bowden, G. H. W., Ellwood, D. C., and Hamilton, I. R. (1979). "Microbial ecology of the oral cavity," in *Advances in Microbial Ecology*, ed. M. Alexander (New York, NY: Plenum Press), 135–217. doi: 10.1007/978-1-4615-8279-3\_4
- Burton, J. P., Chilcott, C. N., Moore, C. J., Speiser, G., and Tagg, J. R. (2006). A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J. Appl. Microbiol.* 100, 754–764. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02837.x
- Burton, J. P., Drummond, B. K., Chilcott, C. N., Tagg, J. R., Thomson, W. M., Hale, J. D., et al. (2013). Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J. Med. Microbiol.* 62, 875–884. doi: 10.1099/jmm.0.056663-0
- Cagetti, M. G., Marstroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P., and Campus, G. (2013). The use of probiotic strains in caries prevention:

- a systematic review. *Nutrients* 5, 2530–2550. doi: 10.3390/nu5072530
- Caglar, E., Kuscuo, O. O., Cildir, S. K., Kuvvetli, S. S., and Sandalli, N. (2008a). A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Int. J. Paedr. Dent.* 18, 35–39.
- Caglar, E., Kuscuo, O. O., Selvi Kuvvetli, S., Kavaloglu Cildir, S., Sandalli, N., and Twetman, S. (2008b). Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol. Scand.* 66, 154–158. doi: 10.1080/00016350802089467
- Caglar, E., Sandalli, N., Twetman, S., Kavaloglu, S., Ergeneli, S., and Selvi, S. (2005). Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol. Scand.* 63, 317–320. doi: 10.1080/00016350510020070
- Camelo-Castillo, A., Benítez-Páez, A., Belda-Ferré, P., Cabrera-Rubio, R., and Mira, A. (2014). *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the Mitis group. *Int. J. Syst. Appl. Microbiol.* 64, 60–65. doi: 10.1099/ijso.0.054098-0
- Camelo-Castillo, A., Mira, A., Pico, A., Nibali, L., Henderson, B., and Tomás, I. (2015). Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front. Microbiol.* 6:119. doi: 10.3389/fmicb.2015.00119
- Campus, G., Cocco, F., Carta, G., Cagetti, M. G., Simark-Mattson, C., Strohmeier, L., et al. (2014). Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clin. Oral Investig.* 18, 555–561. doi: 10.1007/s00784-013-0980-9
- Chuang, L. C., Huang, C. S., Ou-Yang, L. W., and Lin, S. Y. (2011). Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. *Clin. Oral Investig.* 15, 471–476. doi: 10.1007/s00784-010-0423-9
- Fejerskov, O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 38, 182–191. doi: 10.1159/000077753
- Firestone, A. R., Imfeld, T., Schiffer, S., and Lutz, F. (1987). Measurement of interdental plaque pH in humans with an indwelling glass pH electrode following a sucrose rinse: a long-term retrospective study. *Caries Res.* 21, 555–558. doi: 10.1159/000261066
- Gonzales, T., and Robert-Baudouy, J. (1996). Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 319–344. doi: 10.1111/j.1574-6976.1996.tb00247.x
- Grudjanov, A. I., Dmitrieva, N. A., and Fomenko, E. V. (2002). Use of probiotics *Bifidobacterium* and *Acilact* in tablets in therapy of periodontal inflammations [Article in Russian]. *Stomatologiya (Mosk)* 81, 39–43.
- Guglielmetti, S., Taverniti, V., Minuzzo, M., Arioli, S., Stuknyte, M., Karp, M., et al. (2010). Oral bacteria as potential probiotics for the pharyngeal mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3948–3958. doi: 10.1128/AEM.00109-10
- Hajishengallis, G., and Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol. Oral Microbiol.* 6, 409–419. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x
- Hatakka, K., Ahola, A. J., Yli-Knuuttilla, H., Richardson, M., Poussa, T., Meurman, J. H., et al. (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly—A randomized controlled trial. *J. Dent. Res.* 86, 125–130. doi: 10.1177/154405910708600204
- Huang, X., Schulte, R. M., Burne, R. A., and Nascimento, M. M. (2015). Characterization of the arginolytic microflora provides insights into pH homeostasis in human oral biofilms. *Caries Res.* 49, 165–176. doi: 10.1159/000365296
- Iwamoto, T., Suzuki, N., Tanabe, T., Takeshita, T., and Hirofujii, T. (2010). Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on halitosis and oral health: an open-labeled pilot trial. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 110, 201–208. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.03.032
- Jensen, A., Scholz, C. F. P., and Kilian, M. (2016). Re-evaluation of the taxonomy of the Mitis group of the genus *Streptococcus* based on whole genome phylogenetic analyses, and proposed reclassification of *Streptococcus dentisani* as *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* comb. nov., *Streptococcus tigurinus* as *Streptococcus oralis* subsp. *tigurinus* comb. nov., and *Streptococcus oligofermentans* as a later synonym of *Streptococcus cristatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 4803–4820. doi: 10.1099/ijsem.0.001433
- Kang, M. S., Chung, J., Kim, S. M., Yang, K. H., and Oh, J. S. (2006a). Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Res.* 40, 418–425.
- Kang, M. S., Kim, B. G., Chung, J., Lee, H. C., and Oh, J. S. (2006b). Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J. Clin. Periodontol.* 33, 226–232.
- Keller, M. K., Bardow, A., Jensdottir, T., Lykkeaa, J., and Twetman, S. (2012). Effect of chewing gums containing the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. *Acta Odontol. Scand.* 70, 246–250. doi: 10.3109/00016357.2011.640281
- Khalif, M., Dabour, N., Kheadr, E., and Fliss, I. (2010). Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. *Bioresour. Technol.* 101, 7966–7972. doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.053
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S., and Palmer, R. J. Jr. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Biol.* 66, 3486–3505. doi: 10.1128/MMBR.66.3.486-505.2002
- Krasse, P., Carlsson, B., Dahl, C., Paulsson, A., Nilsson, A., and Sinkiewicz, G. (2006). Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed. Dent. J.* 30, 55–60.
- Krespi, Y. P., Shrike, M. G., and Kacker, A. (2006). The relationship between oral malodor and volatile sulfur compound-producing bacteria. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 135, 671–676. doi: 10.1016/j.otohns.2005.09.036
- Kurtz, S., Philipp, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., et al. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 5:R12. doi: 10.1186/gb-2004-5-2-r12
- Liu, Y., Dong, Y., Chen, Y. Y., and Burne, R. A. (2008). Arginine deiminase gene regulation in *Streptococcus gordonii*. *J. Dent. Res.* 87, 714–721.
- Liu, Y. L., Nascimento, M., and Burne, R. A. (2012). Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int. J. Oral Sci.* 4, 135–140. doi: 10.1038/ijos.2012.54
- Mantzourani, M., Fenlon, M., and Beighton, D. (2009a). Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Mol. Oral Microbiol.* 24, 32–37. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00470.x
- Mantzourani, M., Gilbert, S. C., Sulong, H. N., Sheehy, E. C., Tank, S., Fenlon, M., et al. (2009b). The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res.* 43, 308–313. doi: 10.1159/000222659
- Marsh, P. D. (2015). The commensal microbiota and the development of human disease—an introduction. *J. Oral Microbiol.* 7:29128. doi: 10.3402/jom.v7.29128
- Marsh, P. D., Head, D. A., and Devine, D. A. (2015). Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res.* 49, 46–54. doi: 10.1159/000377732
- Martínez, R. C. R., Aynaou, A., Albrecht, S., Schols, H. A., De Martinis, E. C. P., Zoetendal, E. G., et al. (2011). In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 152–158. doi: 10.1016/j.jifoodmicro.2011.06.010
- Matsuoka, T., Sugano, N., Takigawa, S., Takane, M., Yoshimura, N., Ito, K., et al. (2006). Effect of oral *Lactobacillus salivarius* TI 2711 (LS1) administration on periodontopathic bacteria in subgingival plaque. *J. Jpn. Soc. Periodontol.* 48, 315–324. doi: 10.2329/periodo.48.315
- Mayanagi, G., Kimura, M., Nakaya, S., Hirata, H., Sakamoto, M., Benno, Y., et al. (2009). Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria. *J. Clin. Periodontol.* 36, 506–513. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01392.x
- Moncada, G., Maureira, J., Neira, M., Reyes, E., Oliveira Junior, O. B., Faleiros, S., et al. (2015). Salivary urease and ADS enzymatic activity as endogenous protection against dental caries in children. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 39, 358–363. doi: 10.17796/1053-4628-39.4.358
- Petersen, P. E., and Lennon, M. A. (2004). Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 32, 319–321. doi: 10.1111/j.1600-0528.2004.00175.x
- Pham, L. C., van Spanning, R. J. M., Røling, W. F. M., Prosperi, A. C., Terereferwork, Z., ten Cate, J. M., et al. (2009). Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. *Arch. Oral Microbiol.* 54, 132–137. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.09.007

- Plonka, K. A., Pukallus, M. L., Barnett, A. G., Walsh, L. J., Holcombe, T. F., and Seow, W. K. (2012). A longitudinal study comparing mutans streptococci and lactobacilli colonisation in dentate children aged 6 to 24 months. *Caries Res.* 46, 385–393. doi: 10.1159/000339089
- Power, D. A., Burton, J. P., Chilcott, C. N., Dawes, P. J., and Tagg, J. R. (2008). Preliminary investigations of the colonisation of upper respiratory tract tissues of infants using a paediatric formulation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 1261–1263. doi: 10.1007/s10096-008-0569-4
- Pozharitskaia, M. M., Morozova, L. V., Mel'nychuk, G. M., and Mel'nychuk, S. S. (1994). The use of the new bacterial biopreparation Acilact in the combined treatment of periodontitis [Article in Russian]. *Stomatologiya (Mosk)* 73, 17–20.
- Reid, G., Younes, J. A., Van der Mei, H. C., Gloor, G. B., Knight, R., and Busscher, H. J. (2011). Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 27–38. doi: 10.1038/nrmicro2473
- Reyes, E., Martin, J., Moncada, G., Neira, M., Palma, P., Gordan, V., et al. (2014). Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. *J. Appl. Oral Sci.* 22, 235–240. doi: 10.1590/1678-775720130591
- Riccia, D. D., Bizzini, F., Perilli, M., Polimeni, A., Trinchieri, V., Amicosante, G., et al. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis.* 13, 376–385. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x
- Ritthagol, W., Saetang, C., and Teanpaisan, R. (2014). Effect of probiotics containing *Lactobacillus paracasei* SD1 on salivary mutans Streptococci and Lactobacilli in orthodontic cleft patients: a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Cleft Palate Craniofac. J.* 51, 257–263. doi: 10.1597/12-243
- Saha, S., Tomaro-Duchesneau, C., Tabrizian, M., and Prakash, S. (2012). Probiotics as oral health biotherapeutics. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 12, 1207–1220. doi: 10.1517/14712598.2012.693474
- Santarpia, P., Lavender, S., Gittins, E., Vandeven, M., Cummins, D., and Sullivan, R. (2014). A 12-week clinical study assessing the clinical effects on plaque metabolism of a dentifrice containing 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and 1,450 ppm fluoride. *Am. J. Dent.* 27, 100–105.
- Shimauchi, H., Mayanagi, G., Nakaya, S., Minamibuchi, M., Ito, Y., Yamaki, K., et al. (2008). Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Periodontol.* 35, 897–905. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x
- Simon-Soro, A., Guillen-Navarro, M., and Mira, A. (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J. Oral Microbiol.* 6:25443. doi: 10.3402/jom.v6.25443
- Simón-Soro, A., and Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 23, 76–82. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.010
- Simon-Soro, A., Tomás, I., Cabrera-Rubio, R., Catalan, M. D., Nyvad, B., and Mira, A. (2013). Microbial geography of the oral cavity. *J. Dent. Res.* 92, 616–621. doi: 10.1177/0022034513488119
- Stecksén-Blicks, C., Sjöström, I., and Twetman, S. (2009). Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries Res.* 43, 374–381. doi: 10.1159/000235581
- Suzuki, N., Yoneda, M., Tanabe, K., Fujimoto, A., Iha, K., Seno, K., et al. (2014). *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets for the treatment of oral malodor: a double blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 117, 462–470. doi: 10.1016/j.oooo.2013.12.400
- ten Cate, J. M., and Zaura, E. (2012). The numerous microbial species in oral biofilms: how could antibacterial therapy be effective? *Adv. Dental Res.* 24, 108–111. doi: 10.1177/0022034512450028
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C., Knight, R., and Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 18, 804–810. doi: 10.1038/nature06244
- Volozhin, A. I., Il'in, V. K., Maksimovskii, IuM, Sidorenko, A. B., Istranov, L. P., Tsarev, V. N., et al. (2004). Development and use of periodontal dressing of collagen and *Lactobacillus casei* 37 cell suspension in combined treatment of periodontal disease of inflammatory origin (a microbiological study). *Stomatologiya (Mosk)* 83, 6–8.
- World Health Organization [WHO] (1997). *Oral Health Surveys: Basic Methods*. Geneva: World Health Organization.
- Wilson, M. (2005). *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wu, C. C., Lin, C. T., Wu, C. Y., Peng, W. S., Lee, M. J., and Tsai, Y. C. (2015). Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol. Oral Microbiol.* 30, 16–26. doi: 10.1111/omi.12063
- Yin, W., Hu, D. Y., Li, X., Fan, X., Zhang, Y. P., Pretty, I. A., et al. (2013). The anti-carries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate assessed using Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). *J. Dent.* 41(Suppl. 2), S22–S28. doi: 10.1016/j.jdent.2010.04.004
- Zahrndnik, R. T., Magnusson, I., Walker, C., McDonell, E., Hillman, C. H., and Hillman, J. D. (2009). Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. *J. Appl. Microbiol.* 107, 682–690. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04243.x
- Zaura, E., Keijser, B. J. F., Huse, S., and Crielaard, W. (2009). Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 9:259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259
- Zhu, L., and Kreth, J. (2012). The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012:717843. doi: 10.1155/2012/717843

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

Copyright © 2017 López-López, Camelo-Castillo, Ferrer, Simon-Soro and Mira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

---

LIBRO: PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SALUD: EVIDENCIA  
CIENTÍFICA

Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPP)

### "Capítulo 2. La microbiota oral"

M.D. Ferrer García, A. López López, A. Camelo-Castillo, A. Simón-Soro, A. Mira Obrador  
1a Edición, 2016. ISBN: 978-84-16732-09-8

---



## La microbiota oral

2

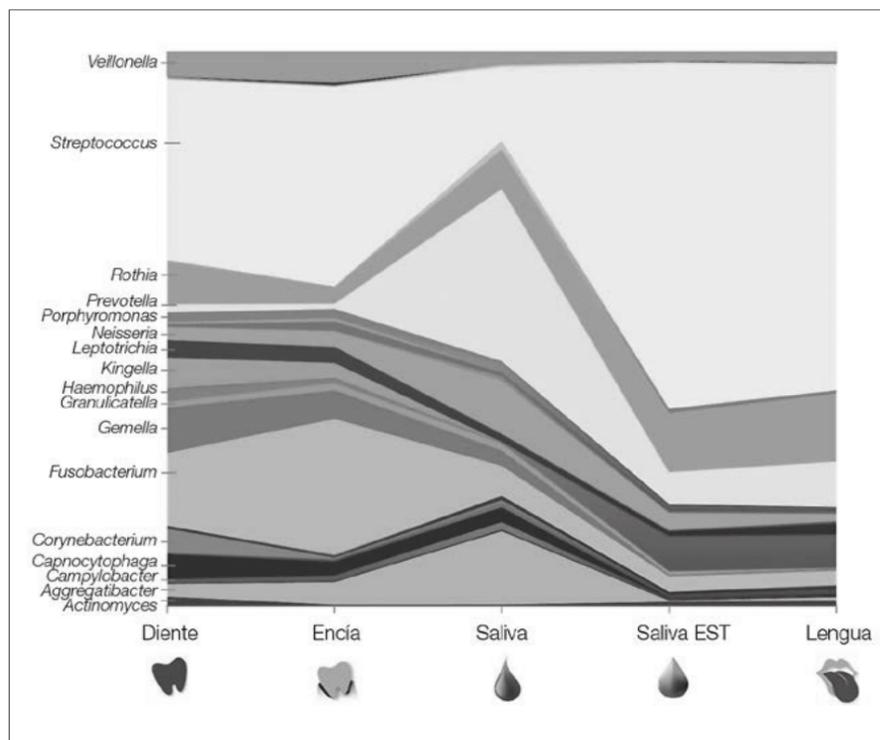
*M.D. Ferrer García, A. López López, A. Camelo-Castillo, A. Simón-Soro, A. Mira*

1. La cavidad oral contiene diversos micronichos donde habitan comunidades microbianas adaptadas a las condiciones específicas de cada uno de ellos.
2. En condiciones de salud, la microbiota presenta un estado de homeostasis donde no se producen sustancias dañinas para los tejidos orales ni se rompe el equilibrio con el sistema inmune del hospedador.
3. Cuando se altera dicho equilibrio, por ejemplo por factores externos como la dieta, se favorece el crecimiento de microorganismos con potencial patogénico (patobiontes), dando lugar a enfermedades orales como la caries, la periodontitis o la halitosis.
4. Aunque dichas enfermedades están causadas por microorganismos, no pueden ser consideradas como infecciosas propiamente dichas, sino como fruto de una disbiosis.
5. Dado que las enfermedades orales son claramente polimicrobianas, las estrategias antibacterianas como las vacunas pueden no ser efectivas. Por ello, los tratamientos con prebióticos y probióticos encaminados a restablecer el equilibrio microbiano y con el hospedador son las más prometedoras.

### MICROBIOTA ORAL

La microbiota oral, cuyo conjunto de microorganismos incluye bacterias, arqueas, hongos, virus y protozoos, es una de las más diversas del cuerpo humano en cuanto a composición se refiere. Además, la cavidad oral es la vía de entrada de los microorganismos del tracto gastrointestinal, y entre sus habitantes se encuentran los primeros que el ser humano vislumbró con el arcaico pero ingenioso microscopio de Anton van Leeuwenhoek en el siglo XVII. Durante más de un siglo, varias decenas de especies bacterianas y fúngicas han sido aisladas de la cavidad oral, pero pronto se constató que el número de microorganismos cultivados era muy inferior al observado en el

microscopio. Así, gracias a las técnicas moleculares independientes del cultivo como la clonación del gen ribosómico 16S, y seguidamente con la aparición de las técnicas de secuenciación de alto rendimiento, se ha podido estimar la diversidad bacteriana total de la cavidad oral, identificando más de 600 especies o filotipos. Alrededor de un tercio de los mismos no han sido cultivados hasta la fecha, o lo han sido en los últimos dos años debido a un esfuerzo en las nuevas metodologías de cultivo, incluidos los suplementos nutricionales y el co-cultivo con especies facilitadoras que proporcionan metabolitos aún desconocidos pero necesarios para el crecimiento de otros organismos.



**FIGURA 1.** Composición microbiana en distintos nichos de la cavidad oral. La gráfica muestra la proporción de distintas bacterias en muestras de placa dental supragingival (superficie dental), placa subgingival (surco de la encía), saliva no estimulada, saliva estimulada recogida tras masticar un chicle estéril de parafina, y dorso de la lengua de un mismo individuo que no presentaba patologías orales. La proporción de bacterias se obtuvo mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA.

Figura elaborada a partir de los datos de Simón-Soro y cols.

Pero esta diversidad no es igual de homogénea en toda la cavidad, sino que existen diferentes micronichos, como son las amígdalas, lengua, mejilla, paladar duro y blando, labios, saliva, surco gingival, encía y dientes que albergan una composición microbiana específica. Probablemente, la razón de esta variabilidad se deba a las diferentes características fisicoquímicas de cada micronicho. Así, por ejemplo, en el estudio de Simón-Soro y cols., en el que definen la diversidad y composición microbiana de distintos nichos de la cavidad oral, se constató que la lengua y la saliva poseen una diversidad bacteriana considerablemente superior al diente y al surco gingival; además, se determinó que la composición bacteriana varía entre dientes e incluso entre las diferentes superficies de un mismo diente, apuntando al oxígeno y al pH como algunos de los posibles factores ambientales causantes de esta diferente distribución dentro de una misma localización anatómica (Fig. 1).

Una de las características más distintivas de la microbiota oral es que sobre ciertas superficies, como el diente, el surco gingival o la lengua, se forma una biopelícula, denominada placa. Los microorganismos no son capaces de adherirse de forma directa al diente, pero sobre éste se forma una película integrada por proteínas salivares como la mucina o el colágeno, que sirven de sustrato para la adhesión específica de ciertos microorganismos. La idea actual es que estos “colonizadores tempranos” se van acumulando, mediante unas interacciones específicas que han sido descifradas en experimentos de coagregación, para dar lugar a toda una sucesión asombrosa de organismos, que al igual que ocurre con el desarrollo de la vegetación tras un incendio, produce un exuberante bosque de diversidad microbiana, que estamos empezando a entender. La bacteria *Fusobacterium nucleatum* parece ser pieza clave en este desarrollo, y ha sido considerada como organismo puente entre los colonizadores tempranos y tardíos de la placa,

encontrándose entre estos últimos algunos de los más patogénicos. Además, se ha establecido que una placa dental madura produce una bajada de pH mucho más acusada tras una comida que una placa inmadura. Conocer la diversidad y la composición microbiana en cada de uno de los diferentes nichos es la idea principal de estos estudios, ya que es herramienta indispensable para revelar asociaciones entre microbiota y salud o enfermedad, así como para realizar una toma de muestras apropiada para estudios etiológicos y epidemiológicos. Por ejemplo, la saliva es el tipo de muestra más frecuentemente utilizada para estudiar enfermedades orales como la caries o la periodontitis, pero se ha demostrado que este fluido contiene una composición microbiana que no se corresponde con la que habita el diente o la encía (Fig. 1), que son los sitios donde tienen lugar dichas enfermedades. Pero también es cierto que para entender el ecosistema oral de una manera más holística, además de describir los cohabitantes que forman estas comunidades complejas, es fundamental entender las interacciones entre ellos y con el hospedador. En este sentido, los nuevos estudios con aproximaciones metagenómicas y metatranscriptómicas en los que se proporciona, respectivamente, toda la información sobre el repertorio genético de la microbiota bajo una determinada circunstancia, como puede ser salud y enfermedad, así como los genes que realmente se están expresando en cada condición, pueden aportar el material necesario para comprender las bases de estas interacciones individuales y en su conjunto. Esta información puede generar estrategias diagnósticas y preventivas futuras que permitan, en lugar de utilizar estrategias antimicrobianas como en las enfermedades infecciosas clásicas, preservar el equilibrio entre la microbiota comensal y el hospedador.

### ENFERMEDADES ORALES

En el ecosistema de la cavidad oral, la microbiota comensal vive en una relación simbiótica con el hospedador, manteniendo un equilibrio crucial para preservar la salud oral. Esta homeostasis, beneficiosa para ambas partes bajo circunstancias normales, en la que el microbio-

ma contribuye a la fisiología del hospedador y a la defensa contra patógenos, y el hospedador aporta nutrientes y un ambiente protegido a la microbiota, puede perturbarse por varios factores y generar una disbiosis que dicte el cambio de salud a enfermedad. Durante la disbiosis se produce un crecimiento excesivo de comunidades de microorganismos comensales con potencial patogénico. La acumulación de estos consorcios de patógenos oportunistas, llamados patobiontes, tiene un papel crucial en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades orales.

Aunque clínicamente la mayoría de las enfermedades orales (como gingivitis, halitosis, periodontitis y caries dental) podrían considerarse de naturaleza infecciosa, su etiología polimicrobiana está claramente demostrada, y por tanto no siguen los preceptos clásicos de los postulados de Koch. Además, al encontrarse los mismos patógenos en niveles bajos también en personas sanas, la enfermedad no puede ser causada por la “infección” o colonización de organismos patógenos, sino por el aumento de dichos patobiontes, que causan una disbiosis o rotura del equilibrio. Este concepto de disbiosis en contraposición a un proceso infeccioso ha sido planteado tanto en periodontitis como en caries, y sugiere por tanto que las estrategias antimicrobianas (vacunas, antibióticos) pueden no ser efectivas.

La colonización de los microorganismos que residen en la cavidad oral puede ser sobre dos tipos de superficie, sólida como dientes e implantes, o mucosa, desde donde continuamente son desprendidos a la saliva. Cada una de estas superficies posee un hábitat específico con diferentes ambientes y condiciones que determinan la microbiota característica. Los microorganismos que residen sobre la superficie del diente lo hacen formando complejas y dinámicas comunidades llamadas biopelículas o placa dental, que acorde a su localización puede clasificarse en dos categorías: la placa dental supragingival, por encima del nivel del margen gingival, y la placa subgingival por debajo del margen gingival.

El cambio de una biopelícula sana a una de perfil cariogénico o/y periodontopatógeno depende de diversos factores entre los que están

los inherentes al hospedador y los determinantes ecológicos específicos de la placa, como la composición y la función de los microorganismos que la forman. Así, en la primera etapa de la caries dental se produce la pérdida del esmalte por desmineralización de su componente, la hidroxiapatita, debido a la producción de ácidos generados tras la fermentación de los azúcares durante el metabolismo de los microorganismos acidogénicos que componen la placa dental supragingival. La disminución del pH provocada por los ácidos generados conduce a la alteración de la homeostasis, al favorecer el crecimiento de las especies acidogénicas y acidouricas, provocando un círculo vicioso que potencia el consorcio patogénico. En cambio, a diferencia de lo que ocurre en la caries, en la enfermedad periodontal se produce un proceso inflamatorio asociado al depósito de placa subgingival, en el que la interacción entre la respuesta inmune del hospedador con el consorcio de patobiontes juega un papel decisivo en la progresión de la misma. Por otra parte, hay que destacar que estas enfermedades polimicrobianas debidas a desequilibrios en la microbiota residente no se limitan a la cavidad oral, sino que tanto la inflamación del tejido periodontal como la evolución de la caries hasta alcanzar la pulpa dentaria, puede facilitar la diseminación intravascular de microorganismos y sus productos por todo el cuerpo, afectando de manera sistémica al hospedador. Estudios recientes indican la relación entre la cronicidad de este proceso inflamatorio a nivel local con el origen y la progresión de enfermedades a nivel sistémico. En esta línea, apuntan que la periodontitis crónica es un factor de riesgo en numerosas enfermedades sistémicas como la diabetes, osteoporosis, enfermedades respiratorias, renales, autoinmunes, cardiovasculares, neurodegenerativas, o el cáncer de páncreas.

Otra enfermedad oral, que se estima que afecta a un tercio de la población y cuya etiología polimicrobiana explica el 90% de los casos, es la halitosis. Los compuestos volátiles como el sulfuro de hidrógeno y el metil mercaptano, provenientes de la metabolización de los aminoácidos sulfurados por las bacterias orales, son los constituyentes más importantes que contribuyen

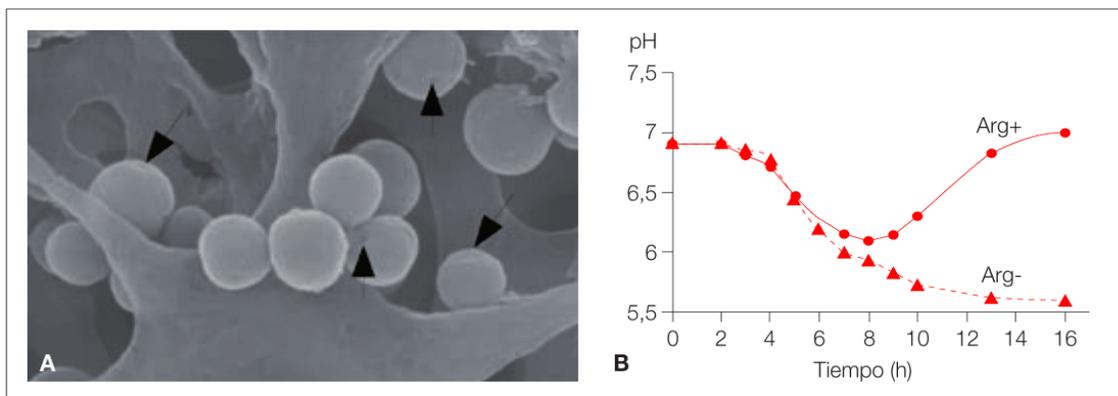
al mal aliento característico de la enfermedad. La producción y liberación de estos compuestos depende, de nuevo, de la microbiota residente, anaerobia principalmente, y de factores asociados al hospedador que condicionan el ambiente. En general, la falta de higiene, el acúmulo de placa y detritus en la superficie de la lengua (cubierta lingual), así como la periodontitis se consideran las mayores causas de halitosis de origen intraoral.

En general, el concepto de que las enfermedades orales se manifiesten como resultado de un desequilibrio en la relación dinámica entre las complejas comunidades multiespecie que forman la biopelícula, el hospedador y el microambiente, está completamente aceptado. Por ello, las estrategias terapéuticas y preventivas deberían ir orientadas a restablecer un ecosistema microbiano saludable. Con este fin, se afianza la idea del uso de probióticos y/o prebióticos, con el objetivo de restaurar el equilibrio en la microbiota oral y modular el sistema inmune.

## **RESTABLECIENDO EL EQUILIBRIO DE LA MICROBIOTA ORAL**

La acción probiótica en la cavidad oral puede estar orientada hacia diferentes dianas. Por un lado, pueden dirigirse a evitar o restaurar la disbiosis mediante la competición con los patógenos oportunistas. En este sentido, el mecanismo de acción puede ser desde la mera competición por el sustrato, bien mediante la ocupación del nicho con anterioridad, evitando la adhesión de estos patobiontes favoreciendo un biofilm de especies saludables, o de manera más directa, disminuyendo su actividad metabólica o inhibiendo su crecimiento a través de la producción de sustancias como antimicrobianos, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas.

Desde otra perspectiva, se ha visto que determinados probióticos orales, al igual que los probióticos intestinales, también pueden tener la capacidad de modular la respuesta inmune inflamatoria. Es ésta una propiedad de crucial importancia en el caso de la enfermedad periodontal, cuya cronicidad en su patogénesis puede ser determinada por una respuesta proinflamatoria de citoquinas. Así, por ejemplo, en el estudio reciente de Szkaradkiewicz y cols., en el



**FIGURA 2.** Doble efecto probiótico de la bacteria *Streptococcus dentisani*. A) Las bacteriocinas producidas por el probiótico inhiben a la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* mediante la producción de poros en la membrana. La imagen de microscopía electrónica muestra la bacteria del patógeno con abundantes poros (indicados por flechas) tras 10 minutos de exposición al sobrenadante del probiótico. B) Curva de pH de *S. dentisani* en presencia (Arg+) y ausencia (Arg-) de arginina en el medio. La bacteria es capaz de regular el pH extracelular transformando la arginina en amonio, tamponando el medio y reduciendo así el riesgo de desmineralización del esmalte dental.

que administraron como probiótico una cepa de *Lactobacillus reuteri* a pacientes con periodontitis crónica, observaron una reducción significativa en la producción de citoquinas inflamatorias en la mayoría de los pacientes, con la consiguiente mejora de los parámetros clínicos. Por otro lado, otro mecanismo de acción de los probióticos orales es a través de la producción de sustancias que directa o indirectamente (moléculas señalizadoras, sinergismos, sustancias tamponadoras) potencien o favorezcan las condiciones fisiológicas (de manera similar a los prebióticos) para el crecimiento de los consorcios de microorganismos saludables, como por ejemplo la capacidad de tamponar el pH del medio. La producción de sustancias alcali, como el amonio, a partir de la urea o la arginina, son un claro ejemplo de aptitud probiótica realmente interesante en el tratamiento y prevención de la caries dental, en la que la disminución del pH producida por el metabolismo de los microorganismos cariogénicos provoca la desmineralización del diente desencadenando el inicio y/o la progresión de la enfermedad.

En esta línea, aunque la mayoría de los probióticos orales se basan exclusivamente en la inhibición del crecimiento de los patógenos oportunistas, los nuevos estudios deberían ir

encaminados a cumplir con los máximos requisitos o características arriba mencionadas con el objetivo de encontrar el probiótico ideal para prevenir o tratar cada una de las enfermedades orales. Desgraciadamente, casi todos los probióticos anticaries se fundamentan, únicamente, en la capacidad de los mismos de inhibir, coagregar o disminuir el crecimiento del agente cariogénico *Streptococcus mutans*, uno de los principales (pero no único ni indispensable) patobiontes de la caries dental, aunque es bien sabido que al encontrarse también en individuos sanos no es evidencia *per se* de enfermedad. En años recientes, se han aislado distintas bacterias orales con capacidad de producir sustancias alcali y otras, como la nueva especie *Streptococcus dentisani*, que a esta capacidad tamponadora añade la inhibición de distintas especies bacterianas cariogénicas (Fig. 2A). Estudios *in vitro* con esta bacteria llevados a cabo en un modelo de boca artificial, demostraron que no sólo era capaz de eliminar a los estreptococos del grupo mutans, sino también a *Veillonella*, que es una de las bacterias más frecuentes en lesiones de caries, favoreciendo el crecimiento de bacterias no cariogénicas como *Streptococcus oralis* o *Neisseria*. Pero además, aparte de la actividad antimicrobiana mediante la producción de bacteriocinas,

esta bacteria tiene una segunda característica que la convierte en un gran aliado contra la caries: su capacidad para metabolizar la arginina. Este aminoácido se encuentra en la saliva y puede ser incorporado con la dieta o incluso en pastas de dientes como prebiótico. El *S. dentisani* tiene la capacidad de utilizar la arginina y transformarla en amonio, que es una molécula que neutraliza el ácido, regulando el pH. Además, estudios posteriores de expresión génica han demostrado que esta transformación se lleva a cabo precisamente cuando el pH exterior se vuelve demasiado ácido (Fig. 2B). Dado que la bacteria puede morir en condiciones extremas ácidas, la producción de amonio es una estrategia de la bacteria para protegerse. Pero al ser precisamente el ácido el que desmineraliza el esmalte, el *S. dentisani* se convierte en un centinela oral que puede proteger el diente *in situ* del ataque acidogénico mediante la activación de la ruta de la arginina.

Además de los *Streptococcus* y *Lactobacillus*, entre los probióticos orales analizados que inhiben la formación del biofilm patogénico, podemos encontrar especies muy diferentes, como algunas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Weissella*. En relación a las bacterias que se están postulando como posibles probióticos para mejorar la salud oral, cabe destacar que debe existir una colonización de la cavidad oral y más concretamente del micronicho donde deba realizar su acción (diente en el caso de la caries, lengua en el caso de la halitosis) para que se manifiesten los efectos deseados del probiótico administrado. Así, el éxito del tratamiento estará condicionado por el origen del probiótico. En este sentido, es de lamentar que la gran mayoría de los probióticos orales como las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, seleccionadas por su probada seguridad alimentaria, no cumplirían con este requisito, al ser bacterias aisladas del intestino, disminuyendo su potencial colonizador de la cavidad oral, tal como se ha demostrado en diversas ocasiones. Incluso en bacterias de origen oral debe tenerse en cuenta el nicho donde el probiótico ha de ejercer su función. Por ejemplo, *Streptococcus salivarius* ha

sido propuesto como probiótico anticaries por su actividad inhibitoria sobre *S. mutans*. Sin embargo, se trata de una bacteria que habita los tejidos blandos de la boca, y tan sólo fue encontrado en menos del 2% de las muestras de placa dental del *Human Microbiome Project*, lo cual disminuye enormemente las perspectivas de que pueda ejercer su acción beneficiosa. Por ello, el desarrollo de probióticos de bacterias obtenidas de placa dental supragingival, como es el caso de la nueva especie *S. dentisani*, aislada de la superficie del diente de individuos sanos, suponen una estrategia prometedora contra la caries, al cumplir por un lado con la capacidad de establecerse en el diente, y por otro con la doble acción antimicrobiana y antiácida.

En cuanto a las perspectivas de futuro, hay que destacar que la aplicación de una sola cepa bacteriana a un ecosistema complejo como la cavidad oral donde habitan cientos de especies puede que no sea eficiente. Un soporte científico cada vez más robusto apunta hacia la combinación de diferentes cepas probióticas que mediante sinergismos potencien su actividad, junto con prebióticos, en un mismo producto simbiótico como método innovador y revolucionario para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, a raíz del éxito clínico de los trasplantes fecales en este tipo de patologías. La posibilidad de realizar trasplantes de microbiota oral de individuos sanos a otros con periodontitis ya ha sido planteada, a la luz de haber identificado poblaciones que varían en su composición microbiana dependiendo del grado de salud bucodental. Sin embargo, los trasplantes de microbiota plantean, además del rechazo social, los problemas de la uniformidad del tratamiento y de la posible transmisión de organismos infecciosos. Por ello, una aproximación consistente en la combinación de distintos microorganismos beneficiosos cultivados de manera controlada para desarrollar probióticos complejos podría maximizar la colonización del consorcio microbiano y aumentar el potencial de su acción beneficiosa, y podría suponer una segunda generación de probióticos para el tratamiento futuro de las enfermedades orales.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 2012; 6: 46-56.
- Benítez-Páez A, Álvarez M, Belda-Ferre P, Rubido S, Mira A, Tomás I. Detection of transient bacteraemia following dental extractions by 16S rDNA pyrosequencing: a pilot study. *PLoS One.* 2013; 8: e57782.
- Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, et al. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front Microbiol.* 2015; 6: 119.
- 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.* 2014; 64(Pt 1): 60-5.
- Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014; 162: 22-38.
- Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27(6): 409-19.
- Huang X, Schulte RM, Burne RA, Nascimento MM. Characterization of the Arginolytic Microflora Provides Insights into pH Homeostasis in Human Oral Biofilms. *Caries Res.* 2015; 49: 165-76.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005; 13(12): 589-95.
- Kolenbrander PE. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci.* 2011; 3: 49-54.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol.* 2005; 187(21): 7193-203.
- Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006; 6(Suppl 1): S14.
- Marsh PD, Head DA, Devine DA. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res.* 2015; 49 Suppl 1: 46-54.
- Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E. *Dental Caries: The Disease and its Clinical Management.* 3rd edition; 2015.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001; 183: 3770-83.
- Pham LC, van Spanning RJM, Röling WFM, Prosperi AC, Terefework Z, Ten Cate JM, Crielaard W, Zaura E. Effects of probiotic *L salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. *Arch Oral Biol.* 2009; 54: 132-7.
- Pozhitkov AE, Leroux BG, Randolph TW, Beikler T, Flemmig TF, Noble PA. Towards microbiome transplant as a therapy for periodontitis: an exploratory study of periodontitis microbial signature contrasted by oral health, caries and edentulism. *BMC Oral Health.* 2015; 15: 125.
- Reyes E, Martin J, Moncada G, Neira M, Palma P, Gordan V, Yevenes I. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. *Journal of Applied Oral Science.* 2014; 22(3): 235-40.
- Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012; 13: R42.
- Scully C, Greenman J. Halitology (breath odour: aetiopathogenesis and management). *Oral Dis.* 2012; 18 (4): 333-45.
- Simon-Soro A, Tomas I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, and Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent. Res.* 2013; 92: 616-21.
- Simon-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trend Microbiol.* 2015; 23: 76-82.
- Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpinski TM. Effect of Oral Administration Involving a Probiotic Strain of *L. reuteri* on Pro-Inflammatory Cytokine Response in Patients with Chronic Periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp.* 2014. 62: 495-500.
- Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. Developing oral probiotics from *S salivarius*. *Future Microbiol.* 2012; 7: 1355-71.



## APÉNDICE

### 3. OTRAS PUBLICACIONES

---





# Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking

Anny J. Camelo-Castillo<sup>1</sup>, Alex Mira<sup>1</sup>, Alex Pico<sup>2</sup>, Luigi Nibali<sup>3</sup>, Brian Henderson<sup>4</sup>, Nikolaos Donos<sup>3</sup> and Inmaculada Tomás<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Health and Genomics, Centre for Advanced Research in Public Health, Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana Foundation, Valencia, Spain

<sup>2</sup> Oral Sciences Research Group, Special Needs Unit, School of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, Santiago, Spain

<sup>3</sup> Periodontology Unit, Department of Clinical Research, University College London-Eastman Dental Institute, London, UK

<sup>4</sup> Department of Microbial Diseases, University College London-Eastman Dental Institute, London, UK

## Edited by:

Christina Maria Joseph Elisabeth Vandenbroucke-Grauls, Vrije Universiteit University Medical Center, Netherlands

## Reviewed by:

Nick Stephen Jakubovics, Newcastle University, UK  
Sibel Acar, Ege University, Turkey  
Malgorzata Anna Mikaszewska-Sokolewicz, Medical University of Warsaw, Poland

## \*Correspondence:

Inmaculada Tomás, School of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, C./Entrerrios s/n, 15872 Santiago, Spain  
e-mail: inmaculada.tomas@usc.es

The etiology of periodontitis has traditionally been associated to a consortium of three bacterial species—the so-called “red-complex” of periodontal disease—which has been the target for most diagnostic and therapeutic strategies. However, other species have also been found to correlate with disease severity. In addition, the influence of smoking on periodontal microbiota is poorly understood. In the current manuscript, the composition of the subgingival microbiota in healthy individuals vs. patients with chronic periodontitis has been investigated using 16S pyrosequencing and the influence of smoking on periodontal composition has been examined. Subgingival bacterial communities were sampled from 82 patients: 22 non-smoking healthy controls, 28 non-smoking periodontal patients, and 32 smoking periodontal patients. Bacterial diversity was higher in periodontal patients than in healthy subjects, which could be interpreted as the consequence of a nutritionally richer environment or a reduced immune competence. Periodontal patients showed a significantly higher prevalence/relative abundance of “established” periopathogens but also other taxa whose role is not well-established and that should be targets for future research. These include *Anaeroglobus*, *Bulleidia*, *Desulfobulbus*, *Filifactor*, *Mogibacterium*, *Phocaeicola*, *Schwartzia* or *TM7*. The microbial community of smoking-associated periodontitis is less diverse and distinct from that of non-smokers, indicating that smoking has an influence on periodontal ecology. Interestingly, the high sequencing coverage allowed the detection at low proportions of periodontal pathogens in all healthy individuals, indicating that chronic periodontitis cannot be strictly considered an infectious disease but the outcome of a polymicrobial dysbiosis, where changes in the proportions of microbial consortia trigger the inflammatory and tissue-degradation responses of the host.

**Keywords:** 16S ribosomal RNA, chronic periodontitis, dental plaque, microbiome, oral health, smoking

## INTRODUCTION

The periodontal diseases are among the most common conditions affecting humans (Dentino et al., 2013). Periodontitis is a microbially-driven inflammatory condition of the gingivae causing destruction of the ligament and alveolar bone supporting the teeth resulting in oral malodor and tooth loss with the resultant loss of quality of life (Al-Harathi et al., 2013).

In 2012, data from the 2009 and 2010 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) on the adult U.S. population showed that over 47% of adults had periodontitis, representing 64.7 million adults (Eke et al., 2012). Assuming this incidence of periodontitis worldwide, then 400 million people in Europe are suffering from one or other of the various forms of periodontitis.

In addition, there is starting to be convincing evidence that periodontitis might be a predisposing factor in the development of major systemic diseases such as coronary artery

disease, cerebrovascular disease, diabetes, respiratory disease, and rheumatoid arthritis (Otomo-Corgel et al., 2012; Gulati et al., 2013).

Periodontal diseases are multifactorial diseases, whose initiation and progression require the participation of a number of factors, particularly the involvement of subgingival bacteria (Socransky et al., 1998). The idea of specificity in the bacterial etiology of periodontitis caused the scientific community to focus on the role of some putative periodontal pathogens such as *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* (Socransky et al., 1998). Page and Kornman (1997) expanded this model to acknowledge the contributions of genetic and environmental risk factors. Smoking is a well-established risk factor for periodontitis progression (Johannsen et al., 2014). However, there are conflicting reports, based on culture or targeted DNA-based assays, on whether or not smoking has an effect on the composition of the subgingival microbiota

# Relationship between periodontitis-associated subgingival microbiota and clinical inflammation by 16S pyrosequencing

A Camelo-Castillo<sup>1</sup>, L Novoa<sup>2</sup>,  
C Balsa-Castro<sup>2</sup>, J Blanco<sup>2</sup>, A Mira<sup>1</sup>  
and I Tomás<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FISABIO Foundation, Centre for Advanced Research in Public Health, Valencia, Spain; <sup>2</sup>Special Needs Unit and Periodontology Unit, Oral Sciences Research Group, School of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Camelo-Castillo A, Novoa L, Balsa-Castro C, Blanco J, Mira A, Tomás I. Relationship between periodontitis-associated subgingival microbiota and clinical inflammation by 16S pyrosequencing. *J Clin Periodontol* 2015; doi: 10.1111/jcpe.12470.

## Abstract

**Aim:** To analyse the relationship between the chronic periodontitis-associated subgingival microbiota and clinical inflammation.

**Material and Methods:** Sixty subjects with generalized chronic periodontitis participated in this study. Patients were divided into two groups according to their bleeding on probing (BOP) scores: BOP-1 group (mean scores  $\leq 50\%$  in sampled sites) and BOP-2 group (mean scores  $> 50\%$ ). Subgingival bacterial samples from periodontal patients were studied by pyrosequencing PCR products of the 16S rRNA gene and by real-time PCR.

**Results:** In all the analysed subgingival samples, 102 bacterial genera and 203 species (from 41 genera of interest) were identified. Rarefaction curves showed a greater number of bacterial species in samples from BOP-2 group compared to BOP-1 group. The BOP-1 group had significantly higher abundance percentages of *Anaeroglobus* (especially, *A. geminatus*), *Capnocytophaga* (especially *C. gingivalis*), *TM7* and *Veillonella*. The BOP-2 had significantly higher abundance percentages of *Desulfobulbus* (especially *D. propionicus*), *Eubacterium* (especially *E. saphenum*), *Filifactor alocis*, *Streptococcus constellatus*, *Tannerella* (especially, *T. forsythia*) and *Treponema*.

**Conclusion:** 16S pyrosequencing revealed that increased inflammation, at sites with periodontitis, is associated with a more diverse subgingival microbiota and specific changes in the bacterial composition, involving “established” periopathogens, symbionts and novel low-abundance pathobionts.

Key words: 16S ribosomal RNA; bacterial load; chronic periodontitis; microbiome; pyrosequencing; subgingival plaque

Accepted for publication 7 October 2015

## Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that they have no conflict of interests. The funding institutions had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

This work was supported by project PI11/01383 from Carlos III Institute of Health (General Division of Evaluation and Research Promotion, Madrid, Spain), which is integrated in National Plan of Research, Development and Innovation (PN I + D + I 2008–2011). This project was co-financed by European Regional Development Fund (ERDF 2007–2013).

This work was also funded by project EM2014/025 from Regional Ministry of Culture, Education and University (regional government of Galicia, Spain), which is integrated in Regional Plan of Research, Innovation and Development 2011–2015.

Article

# Salivary Immune and Metabolic Marker Analysis (SIMMA): A Diagnostic Test to Predict Caries Risk

Alex Mira \*, Alejandro Artacho, Anny Camelo-Castillo, Sandra Garcia-Esteban and Aurea Simon-Soro

Center for Advanced Research in Public Health, FISABIO Foundation, Valencia 46020, Spain; artacho\_ale@gva.es (A.A.); camelo\_ann@gva.es (A.C.-C.); garcia\_sanest@gva.es (S.G.-E.); simon.aurea@gmail.com (A.S.-S.)

\* Correspondence: mira\_ale@gva.es; Tel.: +34-961-925-925

Received: 21 April 2017; Accepted: 16 June 2017; Published: 27 June 2017

**Abstract:** By using ELISA and colorimetric tests, we have measured 25 compounds in individuals with and without dental caries at different time points of dental biofilm formation and time of the day. We find that some compounds appear to be affected by circadian rhythms, others by dental plaque maturity, and others show constant values during a 24 h period. Using univariate analysis and cross-validation techniques, we have selected six components measured at specific time points that maximize the diagnostic separation of health and disease conditions. Two out of the six selected compounds are related to immune competence, another two to the adhesion capacity of micro-organisms, and another two to acid production or pH buffering. We conclude that, in order to design a robust caries risk test, the time of saliva sampling must be standardized and biomarkers from different categories must be included. The preliminary data shown in this paper provide a proof of principle of a caries risk test based on risk-associated categories. Thus, the test will provide not only a general caries risk assessment, but also the likely biological origin of that risk, namely: immune imbalance, and/or a tendency to adhesion of cariogenic organisms, and/or a lack of acid buffering. When tested longitudinally and validated in larger cohorts, this could open the possibility to develop preventive and personalized treatments.

**Keywords:** saliva; dental caries; circadian rhythms; immune system; buffering capacity; pH; adhesion; microorganisms; toothpaste

## 1. Introduction

Dental caries (tooth decay) is the most prevalent chronic disease in the world. Data from the World Health Organization indicate that 80% of the human population suffers or has suffered from it, and it affects over 50% of the population at school age [1]. Dental caries is caused by the acid produced by micro-organisms inhabiting the oral cavity, as a consequence of the fermentation of dietary sugars. This lowers the pH on the tooth surface under a certain threshold, below which the enamel demineralizes, initiating a caries lesion [2]. Once the lesion is cavitated, it is irreversible and the damage can only be restored through clinical intervention, for instance a restoration or a tooth implant.

Although cavities are caused by micro-organisms, dental caries is a multi-factorial disease [3]. Apart from the microbiology, both human-related factors such as immune competence, enamel strength, tooth shape, or saliva buffering effect, and external environmental factors such as diet, oral hygiene, or fluoride exposure have a direct impact on tooth decay rates [4].

Despite its high prevalence and its direct and indirect impact on human health, there are still no effective diagnostic tools to predict dental caries, and therefore dedicate the appropriate personalized measures to prevent the disease. A large effort has been dedicated to study bacterial composition in the oral cavity [5–9], with the aim of developing tests that could relate the presence of acidogenic



## BIBLIOGRAFÍA

---



## BIBLIOGRAFÍA

1. Aas, J., Griffen, A., Dardis, S., Lee, A., Olsen, I., Dewhirst, F., Leys, E. and Paster, B. (2008). Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), pp.1407-1417.
2. Abdel-Aziz, S. and A, A. (2014). Bacterial Biofilm: Dispersal and Inhibition Strategies. *Scholarena Journal of Biotechnology*, 1(1).
3. Abiko, D., Saafan, A., Moustafa, D. and Al-Sayed, M. (2018). The effect of combining laser and nanohydroxy-apatite on the surface properties of enamel with initial defects. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 10(5), e425-e430.
4. Abiko, Y. (2000). Passive Immunization Against Dental Caries and Periodontal Disease: Development of Recombinant and Human Monoclonal Antibodies. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(2), pp.140-158.
5. Abusleme, L., Dupuy, A., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J., Strausbaugh, L., Gamonal, J. and Diaz, P. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*, 7(5), pp.1016-1025.
6. Acevedo, AM., Machado, C., Rivera, LE., Wolff, M. and Kleinberg, I.(2005). The inhibitory effect of an arginine bicarbonate/calcium carbonate CaviStat-containing dentifrice on the development of dental caries in Venezuelan school children. *Journal of Clinical Dentistry*, 16 : 63-70
7. Acevedo, AM., Montero, M., Rojas-Sánchez, F., Machado, C., Rivera, LE., Wolff, M. and Kleinberg, I. (2008). Clinical evaluation of the ability of CaviStat in a mint confection to inhibit the development of dental caries in children. *Journal of Clinical Dentistry*, 19 : 1-8
8. Acton, R., Dasanayake, A., Harrison, R., Li, Y., Roseman, J., Go, R., Wiener, H. and Caufield, P. (1999). Associations of MHC genes with levels of caries-inducing organisms and caries severity in African-American women. *Human Immunology*, 60(10), pp.984-989.
9. Adams, M. and Marteau, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *International Journal of Food Microbiology*, 27: pp.262-264.
10. Aggett, P., Antoine, J., Asp, N., Bellisle, F., Contor, L., Cummings, J., Howlett, J., Müller, D., Persin, C., Pijls, L., Rechkemmer, G., Tuijelaars, S. and Verhagen, H. (2005). PASSCLAIM: process for the assessment of scientific support for claims on foods. *European Journal of Nutrition*, 44 Suppl 1:i5-30.
11. Ahmadi, E., Fallahi, S., Alaeddini, M, and Hasani Tabatabaei, M. (2013). Severe dental caries as the first presenting clinical feature in primary Sjögren's syndrome. *Caspian Journal of Internal Medicine*, (4),pp.731-4
12. Ahn, Y., Kim, G., Lim, Y., Baek, Y. and Kim Y. (2003) Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*, 13, pp.303-311.
13. Al Nowaiser, A., Roberts, G., Trompeter, R., Wilson, M. and Lucas, V. (2003). Oral health in children with chronic renal failure. *Pediatric Nephrology*, 18(1), pp.39-45

14. Alcaraz, L., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M. and Mira, A. (2012). Identifying a healthy oral microbiome through metagenomics. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, pp.54-57.
15. Alok, A., Singh, I., Singh, S., Kishore, M., Jha, P. and Iqbal, M. (2017). Probiotics: A New Era of Biotherapy. *Advanced Biomedical Research*, 6(1), p.31.
16. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. and Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp.403-410.
17. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. and Kuipers, O. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(7), pp.2939-2951.
18. Aminabadi, N., Erfanparast, L., Ebrahimi, A. and Oskouei, S. (2011). Effect of chlorhexidine pretreatment on the stability of salivary lactobacilli probiotic in six- to twelve-year-old children: a randomized controlled trial. *Caries Research*, 45(2), pp.148-154.
19. Aoba, T., Moreno, E. and Hay, D. (1984). Inhibition of apatite crystal growth by the amino-terminal segment of human salivary acidic proline-rich proteins. *Calcified Tissue International*, 36(1), pp.651-658.
20. Aparna, A., Hegde, M. and Shetty, V. (2013). Evaluation of microflora of root carious lesions in different age groups: A microbiological study. *European Journal of General Dentistry*, 2(2), p.130.
21. Armau, E., Bousque, J., Boue, D. and Tiraby, G. (1988). Isolation of lytic bacteriophages for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Dental Research*, (67), p.121
22. Arunachalam, K., Gill, H. and Chandra, R. (2000). Enhancement of natural immune function by dietary consumption of Bifidobacterium lactis (HN019). *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(3), pp.263-267.
23. Ashraf, R. and Shah, N. (2014). Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), pp.938-956.
24. Ástvaldsdóttir, Á., Naimi-Akbar, A., Davidson, T., Brolund, A., Lintamo, L., Attergren Granath, A., Tranæus, S. and Östlund, P. (2016). Arginine and caries prevention: a systematic review. *Caries Research*, 50, pp.383-393.
25. Autio-Gold, J. (2008). The Role of Chlorhexidine in Caries Prevention. *Operative Dentistry*, 33(6), pp.710-716.
26. Bachrach, G., Leizerovici-Zigmond, M., Zlotkin, A., Naor, R. and Steinberg, D. (2003). Bacteriophage isolation from human saliva. *Letters in Applied Microbiology*, 36(1), pp.50-53.
27. Badet, C. and Thebaud, N. (2008). Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature. *The Open Microbiology Journal*, 2(1), pp.38-48.
28. Baele, M., Baele, P., Vanechoutte, M., Storms, V., Butaye, P., Devriese, L., Verschraegen, G., Gillis, M. and Haesebrouck F. (2000). Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of Enterococcus species. *Journal of Clinical Microbiology*, (38), pp.4201-4207.
29. Baele, M., Storms, V., Haesebrouck, F., Devriese, L., Gillis, M., Verschraegen, G., de Baere, T. and Vanechoutte, M. (2001). Application and evaluation of the interlaboratory reproducibility of tRNA intergenic length polymorphism analysis

- (tDNA-PCR) for identification of *Streptococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), pp.1436-1442.
30. Balakrishnan, M., Simmonds, R. and Tagg, J. (2001). Diverse activity spectra of bacteriocin-like inhibitory substances having activity against mutans Streptococci. *Caries Research*, 35(1), pp.75-80.
  31. Banas, J. (2004). Virulence properties of *Streptococcus Mutans*. *Frontiers in Bioscience*, 9(1-3), p.1267.
  32. Banas, J., Zhu, M., Dawson, D., Cao, H. and Levy, S. (2016). PCR-Based Identification of Oral Streptococcal Species. *International Journal of Dentistry*, 2016, pp.1-8.
  33. Banoczy, J., Rugg-Gunn, A. and Woodward, M. (2013). Milk fluoridation for the prevention of dental caries. *Acta medica academica*. 42(2),pp.156-67
  34. Bao, X., de Soet, J., Tong, H., Gao, X., He, L., van Loveren, C. and Deng, D. (2015). *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* in biofilms at both neutral pH and cariogenic conditions. *PLOS ONE*, 10(6), p.e0130962
  35. Barefoot, S. and Klaenhammer, T. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 45(6), pp.1808–1815.
  36. Becker, M., Paster, B., Leys, E., Moeschberger, M., Kenyon, S., Galvin, J., Boches, S., Dewhirst, F. and Griffen, A. (2002). Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), pp.1001-1009.
  37. Begley, M., Hill, C. and Gahan, C. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3):1729-1738.
  38. Belda-Ferre, P., Alcaraz, L., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M. and Mira, A. (2012). The oral metagenome in health and disease. *The ISME Journal*, 6(1), pp.46-56.
  39. Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Moya, A. and Mira, A. (2011). Mining virulence genes using metagenomics. *PloS ONE*, 6(10), e24975.
  40. Bennedsen, M., Stuer-Lauridsen, B., Danielsen, M., and Johansen, E. (2011). Screening for antimicrobial resistance genes and virulence factors via genome sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), pp.2785-2787.
  41. Bik, E., Long, C., Armitage, G., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E., Nelson, K., Gill, S., Fraser-Liggett, C. and Relman, D. (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *The ISME Journal*, 4(8), pp.962-974.
  42. Bjorndal, L., Darvann, T. and Lussi, A. (1999). A computerized analysis of the relation between the occlusal enamel caries lesion and the demineralized dentin. *European Journal of Oral Sciences*, 107(3), pp.176-182.
  43. Blakey, K., Feltbower, R., Parslow, R., James, P., Gomez Pozo, B., Stiller, C., Vincent, T., Norman, P., McKinney, P., Murphy, M., Craft, A. and McNally, R. (2014). Is fluoride a risk factor for bone cancer? Small area analysis of osteosarcoma and Ewing sarcoma diagnosed among 0-49-year-olds in Great Britain, 1980-2005. *International Journal of Epidemiology*, 43(1), pp.224-234.
  44. Blanco, V., Cobb, C., Williams, K. and Manch-Citron, J. (1997). In vitro effect of the Sensonic™ toothbrush on *Treponema denticola*. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(5), pp.318-123.

45. Blin, K., Medema, M., Kazempour, D., Fischbach, M., Breitling, R., Takano, E. and Weber, T. (2013). antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), pp.W204-W212.3
46. Bondonno, C., Liu, A., Croft, K., Considine, M., Puddey, I., Woodman, R. and Hodgson, J. (2014). Antibacterial Mouthwash Blunts Oral Nitrate Reduction and Increases Blood Pressure in Treated Hypertensive Men and Women. *American Journal of Hypertension*, 28(5), pp.572-575.
47. Böök, J. and Grahnén, H. (1953). Clinical and genetical studies of dental caries. II. Parents and sibs of adult highly resistant (caries-free) propositi. *Odontol Revy.* 4(1), pp. 1–53
48. Boraas, J., Messer, L. and Till, M. (1988). A Genetic Contribution to Dental Caries, Occlusion, and Morphology as Demonstrated by Twins Reared Apart. *Journal of Dental Research*, 67(9), pp.1150-1155.
49. Bosshard, P., Abels, S., Altwegg, M., Bottger, E. and Zbinden, R. (2004). Comparison of Conventional and Molecular Methods for Identification of Aerobic Catalase-Negative Gram-Positive Cocci in the Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), pp.2065-2073.
50. Bowden, G., Ellwood, D. and Hamilton, I. (1979). “Microbial ecology of the oral cavity,” in *Advances in Microbial Ecology* ed. Alexander M., editor. (New York, NY: Plenum Press;) 135–217.
51. Bowen, W. and Koo. H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*, 45(1), pp.69-86.
52. Bristol, L. (1915). Wound and skin diphtheria as a public health problem. *American Journal of Public Health* (New York, N.Y. : 1912), 5(9), 838-42.
53. Brook, A. (2009). Multilevel complex interactions between genetic, epigenetic and environmental factors in the aetiology of anomalies of dental development. *Archives of Oral Biology*, 54, pp.S3-S17
54. Buchrieser, C., Prentice, M., and Carniel, E. (1998). The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. *Journal of Bacteriology*, 180(9), pp.2321-2329.
55. Bunting, R.(1928). Studies of the relation of *Bacillus acidophilus* to dental caries. *Journal of Dental Research.* (8) pp.22
56. Bunting, R., Nickerson, G. and Hard, D. (1927). Further studies of *Bacillus acidophilus* in its relation to dental caries. *Journal of the American Dental Association.* (14), pp.416
57. Burckhardt, J. and Guggenheim, B. (1980). Increased Smooth-Surface Caries Incidence in Gnotobiotic Rats Immunized with *Actinomyces viscosus*. *Caries Research*, 14(1), pp.56-59.
58. Burton, J., Chilcott, C., Moore, C. and Tagg, J. (2005). O17 Effect of Probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Oral Diseases*, 11(s1), pp.103-103.

59. Burton, J., Chilcott, C., Moore, C., Speiser, G. and Tagg, J. (2006). A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), pp.754-764.
60. Burton, J., Drummond, B., Chilcott, C., Tagg, J., Thomson, W., Hale, J. and Wescombe, P. (2013). Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt\_6), pp.875-884.
61. Burton, J., Wescombe, P., Cadieux, P. and Tagg, J. (2011). Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral streptococci?. *Beneficial Microbes*, 2(2), pp.93-101
62. Busuioac, M., Mackiewicz, K., Buttarò, B.A. and Piggot, P. (2009). Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 191(23), pp.7315-22.
63. Çağlar E., Kusu O. O., Selvi Kuvvetli S., Kavaloglu Cildir S., Sandalli N., Twetman S. (2008). Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontologica Scandinavica*, (66), pp.154–158.
64. Çağlar, E., Cildir, S., Sandallin, N., Ergeneli, S. and Twetman S. (2006). Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontologica Scandinavica*, (64), pp.314-318.
65. Çağlar, E., Kusu, O., Cildir, S., Kuvvetli, S. and Sandalli, N. (2008a). A probiotic lozenges administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 18, pp.35-39.
66. Çağlar, E., Onder Kusu, O., Selvi Kuvvetli, S., Kavaloglu Cildir, S., Sandalli, N. and Twetman, S. (2008b). Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontologica Scandinavica*, 66(3), pp.154-158.
67. Çağlar, E., Sandalli, N., Twetman, S., Kavaloglu, S., Ergeneli, S. and Selvi, S. (2005). Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontologica Scandinavica*, (63), pp.317–320.
68. Çağlar, E., Topcuoglu, N., Cildir, S., Sandalli, N. and Kulekci, G. (2009). Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 19, pp.377–381
69. Camelo-Castillo, A., Benitez-Paez, A., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R. and Mira A. (2014). *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt3), pp.60–65
70. Camelo-Castillo, A., Mira, A., Pico, A., Nibali, L., Henderson, B., Donos, N. and Tomás, I. (2015). Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Frontiers in Microbiology*, 6.
71. Campus, G., Cocco, F., Carta, G., Cagetti, M. G., Simark-Mattson, C., Strohmenger, L., and Lingström, P. (2013). Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clinical oral investigations*, 18(2), pp.555-561.

72. Cantore, R., Petrou, I., Lavender, S., Santarpia, P., Liu, Z., Gittins, E., Vandeven, M., Cummins, D., Sullivan, R. and Utgikar, N. (2013). In situ clinical effects of new dentifrices containing 1.5% arginine and fluoride on enamel de- and remineralization and plaque metabolism. *Journal of Clinical Dentistry*, 24 (Spec Iss A), pp. A32-A44.
73. Castillo Pedraza, M., Novais, T., Faustoferri, R., Quivey, R., Terekhov, A., Hamaker, B. and Klein, M. (2017). Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling*, 33(9), pp.722-740.
74. Caufield, P., Dasanayake, A., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J. and Hardin, J. (2000). Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infection and immunity*, 68(7), pp.4018-4023
75. Chen, H. and Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), pp.82-100.
76. Chi, D., Masterson, E., Carle, A., Mancl, L. and Coldwell, S. (2014). Socioeconomic Status, Food Security, and Dental Caries in US Children: Mediation Analyses of Data From the National Health and Nutrition Examination Survey, 2007–2008. *American Journal of Public Health*, 104(5), pp.860-864.
77. Chilcott, C. and Tagg, J. (2007). Antimicrobial composition. US Patent 7226590.
78. Chmurzynska, A. (2010). Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutrition Reviews*, 68(2), pp.87-98.
79. Chokshi, A., Mahesh, P., Sharada, P., Chokshi, K., Anupriya, S. and Ashwini, B. (2016). A correlative study of the levels of salivary *Streptococcus mutans*, lactobacilli and *Actinomyces* with dental caries experience in subjects with mixed and permanent dentition. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 20(1), p.25.
80. Chuang, L., Huang, C., Ou-Yang, L. and Lin, S. (2010). Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. *Clinical Oral Investigations*, 15(4), pp.471-476.
81. Claesson, R., Edlund, M., Persson, S. and Carlsson, J. 1990. Production of volatile sulfur compounds by various *Fusobacterium* species. *Oral Microbiology and Immunology*, 5, pp.137–142.
82. Clark, F. (1871). *Report of the Committee on Dental Therapeutics*. Southern Dental Associates. 3 rd. Annual Meeting, p. 40
83. Clarke, J. (1924). On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British Journal of Experimental Pathology*, 5(3), pp141-147
84. Clarridge, J., Attorri, S., Zhang, Q. and Bartell, J. (2001). 16S Ribosomal DNA sequence analysis distinguishes biotypes of *Streptococcus bovis*: *Streptococcus bovis* biotype II/2 is a separate genospecies and the predominant clinical isolate in adult males. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), pp.1549-1552
85. Cleveland, J., Montville, T., Nes, I. and Chikindas, M. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, pp.1–20.
86. Coico R. (2005) Gram staining. Current protocols in microbiology. Appendix 3: Appendix 3C. doi: 10.1002/9780471729259.mca03cs00.

87. Collado, M., Cernada, M., Bäuerl, C., Vento, M. and Pérez-Martínez, G. (2012). Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*, 3(4), pp.352-365.
88. Collins, J., Thornton, G. and O'Sullivan, G. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, (8), pp.487-490.
89. Conangla, G., Rodríguez, L., Alonzo-Tarres, C., Avila, A. and de la Campa, A. (2004). *Streptococcus salivarius* meningitis after spinal anesthesia. *Neurologia*, (19), pp.331-333
90. Conrads, G., Bockwoldt, J., Kniebs, C. and Abdelbary, M. (2018). Commentary: Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: the case of *Streptococcus dentisani*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 340.
91. Corthésy, B., Gaskins, H. and Mercenier, A. (2007). Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. *The Journal of Nutrition*, 137(3), pp.781S-790S.
92. Cotter, P., Hill, C. and Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), pp.777-788.
93. Coventry, M., Gordon, J., Alexander, M., Hickey, M. and Wan, J. (1996). A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), pp.1764-1769.
94. Coventry, M., Wan, J., Gordon, J., Mawson, R. and Hickey, M. (1996). Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. *Journal of Applied Microbiology*, 80, pp.91-98
95. Curran, T., Lieou, J. and Marquis, R. (1995). Arginine deiminase system and acid adaptation of oral streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), pp.4494-4496.
96. Dalmasso, M., de Haas, E., Neve, H., Strain, R., Cousin, F., Stockdale, S., Ross, R. and Hill, C. (2015). isolation of a novel phage with activity against *Streptococcus mutans* biofilms. *PLoS ONE*, 10(9), p.e0138651
97. Darveau, R., Hajishengallis, G. and Curtis, M. (2012). *Porphyromonas gingivalis* as a Potential Community Activist for Disease. *Journal of Dental Research*, 91(9), pp.816-820.
98. Dasanayake, A., Wiener, H., Li, Y., Vermund, S., Vermund, S. and Caufield, P. (2002). Lack of effect of chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* transmission and caries in mothers and children. *Caries Research*, 36(4), pp. 288-93
99. De Gheldre, Y., Vandamme, P., Goossens, H. and Struelens, M. (1999). Identification of clinically relevant viridans streptococci by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(4), pp.1591-1598.
100. de Saizieu, A., Gardès, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T. J., Keck, W., Amrein, K. E. and Lange, R. (2000). Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *Journal of bacteriology*, 182(17), pp.4696-4703.
101. de Vrese, M., Winkler, P., Rautenberg, P., Harder, T., Noah, C., Laue, C., Ott, S., Hampe, J., Schreiber, S., Heller, K. and Schrezenmeir, J. (2005). Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on

- common cold episodes: A double blind, randomized, controlled trial. *Clinical Nutrition*, 24(4), pp.481-491.
102. Delisle, A. and Rostkowski, C. (1993). Lytic bacteriophages of *Streptococcus mutans*. *Current Microbiology*, 27(3) pp.163–167.
  103. Delisle, A., Guo, M., Chalmers, N., Barcak, G., Rousseau, G. and Moineau, S. (2012). Biology and Genome Sequence of *Streptococcus mutans* Phage M102AD. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), pp.2264-2271.
  104. Deshpande, A. and Jadad, A. (2008). The impact of polyol-containing chewing gums on dental caries. *The Journal of the American Dental Association*, 139(12), pp.1602-1614.
  105. Deutscher, J., Francke, C. and Postma, P. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), pp.939-1031.
  106. Devine, D. and Marsh, P. (2009). Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *Journal of Oral Microbiology*, 1(1), p.1949.
  107. Dibdin, G. and Dawes, C. (1997). A mathematical model of the influence of salivary urea on the pH of fasted dental plaque and on the changes occurring during a cariogenic challenge. *Caries Research*, 32(1), pp.70-74.
  108. Do, C. B., Mahabhashyam, M. S., Brudno, M. and Batzoglu, S. (2005). ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome research*, 15(2), 330-40.
  109. Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), pp.414-424.
  110. Doehle, P. (1889). Beobachtungen über einen Antagonisten des Milzbrandes: Inaug.Diss.Druck von Schmidt u. Klaunig,
  111. Douglas, W. (1959). *A history of dentistry in Colorado 1859-1959*. [Denver]: [Colorado State Dental Association].
  112. Drancourt, M., Roux, V., Fournier, P. and Raoult, D. (2004). rpoB Gene sequence-based identification of aerobic gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), pp.497-504.
  113. Drucker, D., Fitzgerald, R. and Green, R. (1981). Comparative cariogenicity of oral streptococci in different strains of gnotobiotic rats. *Archives of Oral Biology*, 26(7), pp.625-627
  114. Drucker, D., Shakespeare, A. and Green, R. (1984). *In-vivo* dental plaque-forming ability and relative cariogenicity of the bacteria *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis* I and II in mono-infected gnotobiotic rats. *Archives of Oral Biology*, 29(12), pp.1023-1031
  115. Drucker, D., Shakespeare, A. and Green, R. (1984). The production of dental plaque and caries by the bacterium *Streptococcus salivarius* in gnotobiotic WAG/RIJ rats. *Archives of Oral Biology*, 29(6), pp.437-443.
  116. Dzidic, M., Collado, M., Abrahamsson, T., Artacho, A., Stensson, M., Jenmalm, M. and Mira, A. (2018). Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *The ISME Journal*, 12(9), pp.2292-2306.

117. Eckert, R., Sullivan, R. and Shi, W. (2012). Targeted antimicrobial treatment to re-establish a healthy microbial flora for long-term protection. *Advances in Dental Research*, 24(2), pp.94-97.
118. Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E. and Hirvi, T. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. Journal of AOAC International*, 76, pp.575-577
119. Ekstrand, K., Ricketts, D., Kidd, E., Qvist, V. and Schou, S. (1998). Detection, diagnosing, monitoring and logical treatment of occlusal caries in relation to lesion activity and severity: an in vivo examination with histological validation. *Caries Research*, 32(4), pp.247-254.
120. Epstein, S., Mandel, I. and Scopp, I. (1980). Salivary composition and calculus formation in patients undergoing hemodialysis. *Journal of Periodontology*, 51(6), pp.336-338.
121. FAO/WHO.(2006) Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. En “FAO Food and Nutrition Paper 85”, *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación* ISBN 92-5-105513-0. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
122. Fejerskov, O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Research*, 38(3), pp.182-191.
123. Fejerskov, O. and Kidd, E. (2008). *Dental caries the disease and its clinical management* 2nd edition. Blackwell Munksgaard (UK).
124. Fejerskov, O., Nyvad, B. and Kidd, E. (2015). *Dental caries*. Chichester (UK): Wiley.
125. Ferrer, M. and Mira, A. (2016). Oral biofilm architecture at the microbial scale. *Trends in Microbiology*, 24(4), pp.246-248
126. Fitzgerald, R. and Keyes P. (1960). Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *Journal of the American Dental Association*, 61, pp.9-19.
127. Florey, H. (1946). The use of micro-organisms for therapeutic purposes. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 19, pp.101-117.
128. Fölster-Holst, R., Müller, F., Schnopp, N., Abeck, D., Kreiselmaier, I., Lenz, T., von Räden, U., Schrezenmeir, J., Christophers, E. and Weichenthal, M. (2006). Prospective, randomized controlled trial on *Lactobacillus rhamnosus* in infants with moderate to severe atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 155(6), pp.1256-1261.
129. Franz, C., van Belkum, M., Holzapfel, W., Abriouel, H. and Galvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(3), pp.293-310
130. Freedman, M. and Coykendall, A. (1975). Variation in internal polysaccharide synthesis among *Streptococcus mutans* strains. *Infection and Immunity*, 12, pp.475-479
131. Fukushima, Y., Miyaguchi, S., Yamano, T., Kaburagi, T., Iino, H., Ushida, K. and Sato, K. (2007). Improvement of nutritional status and incidence of infection in hospitalised, enterally fed elderly by feeding of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533). *British Journal of Nutrition*, 98(05).
132. Gaillard, M., Vallaes, T., Vorholter, F., Minoia, M., Werlen, C., Sentschilo, V., Puhler, A. and van der Meer, J. (2006). The clc Element of Pseudomonas sp. Strain

- B13, a Genomic Island with Various Catabolic Properties. *Journal of Bacteriology*, 188(5), pp.1999-2013.
133. Gal-Mor, O. and Finlay, B. (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*, 8, pp.1707–1719.
  134. Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. and Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1), pp.51-70.
  135. Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A. and Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, pp.765 – 771.
  136. Garnier, F., Gerbaud, G., Courvalin, P. and Galimand, M. (1997). Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, (35), pp.2337–2341.
  137. Geraldini, S., Soares, E., Alvarez, A., Farivar, T., Shields, R., Sinhoreti, M. and Nascimento, M. (2017). A new arginine-based dental adhesive system: formulation, mechanical and anti-caries properties. *Journal of Dentistry*, 63, pp.72-80.
  138. Giacaman, R., Torres, S., Gómez, Y., Muñoz-Sandoval, C. and Kreth, J. (2015). Correlation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization and ex vivo hydrogen peroxide production in carious lesion-free and high caries adults. *Archives of Oral Biology*, 60(1), pp.154–159.
  139. Gibbons, R. and Socransky, S. (1962). Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques. *Archives of Oral Biology*, 7(1), pp.73-IN13
  140. Gill, H., Rutherford, K., Cross, M. and Gopal, P. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(6), pp.833-839.
  141. Gilliland, S. and Speck, M. (1977). Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Applied and environmental microbiology*, 33(1), pp.15-8.
  142. Gillor, O., Etzion, A. and Riley, M. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), pp.591-606.
  143. Goadby, K. (1900). Micro-organisms in dental caries. *Journal British, Dental Association* 21:65
  144. Gobernado, M. and López-Hontangas, J. (2003). Identificación bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(Supl.2), pp.54-60.
  145. Gold, J., Bayar, S. and Salem, R. (2004). Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Archives of Surgery*, 139(7), pp.760-765
  146. Gordan, V., Garvan, C., Ottenga, M., Schulte, R., Harris, P., McEdward, D. and Magnusson, I. (2010). Could alkali production be considered an approach for caries control. *Caries Research*, 44(6), pp.547-554.
  147. Goris, J., Klappenbach, J., Vandamme, P., Coenye, T., Konstantinidis, K. and Tiedje, J. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), pp.81-91.

148. Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 93, pp.1040–1041.
149. Gross, E. and Morell, J. (1971). The structure of nisin. *Journal of the American Chemical Society*, 93, pp.4634–4635.
150. Gross, E., Beall, C., Kutsch, S., Firestone, N., Leys, E. and Griffen, A. (2012). Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16s rRNA community analysis. *PLoS ONE*, 7(10), p.e47722.
151. Grüber, C., Wendt, M., Sulser, C., Lau, S., Kulig, M., Wahn, U., Werfel, T. and Niggemann, B. (2007). Randomized, placebo-controlled trial of *Lactobacillus rhamnosus* GG as treatment of atopic dermatitis in infancy. *Allergy*, 62(11), pp.1270-1276
152. Grudianov, A., Dmitrieva, N. and Fomenko, E. (2002). Use of probiotics *Bifidumbacterin* and *Acilact* in tablets in therapy of periodontal inflammations [Article in Russian]. *Stomatologïia (Mosk)*, 81, pp.39-43.
153. Guarner, F., Khan, A., Carisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J. and Mair, T. (2017). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Probiotics and Prebiotics. 1-27. Disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-english-2017.pdf>
154. Guo, L., McLean, J., Lux, R., He, X. and Shi, W. (2015). The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. *Scientific Reports*, 5(1).
155. Gustafsson, B., Quensel, C., Lanke, L., Lundqvist, C., Grahnén, H., Bonow, B. and Krasse, B. (1954). The Vipeholm dental caries study: the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontologica Scandinavica*, 11, pp.232–264.
156. Hacker, J and Kaper, J. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, 54, pp.641–679
157. Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. and Goebel, W. (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extra intestinal *Escherichia coli* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 8(3), pp.213-225.
158. Hahn, K., Faustoferri, R. and Quivey R. (1999). Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. *Molecular Microbiology*, 31, 1489–1498.
159. Hajishengallis, G. and Lamont, R. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, 27(6), pp.409-419.
160. Hajishengallis, G., Darveau, R. and Curtis, M. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), pp.717-725.
161. Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M., McIntosh, M., Alsam, A., Kirkwood, K., Lambris, J., Darveau, R. and Curtis, M. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host & Microbe*, 10(5), pp.497-506.

162. Hamada, S. and Slade, H.(1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44(2), pp.331–384
163. Hammam, R., Fernandez, B., Lacroix, C. and Fliss I. (2013). Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, pp.2947–2967.
164. Hanna, M., Ferguson, R., Li, Y. and Cvitkovitch, D. (2001). *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 183, pp.5964–5973.
165. Harding, M. and O'Mullane, D. (2013). Water fluoridation and oral health. *Acta Medica Academica*. (42)pp.131–139
166. Hatakka, K., Ahola, A., Yli-Knuutila, H., Richardson, M., Poussa, T., Meurman, J. and Korpela, R. (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly—A randomized controlled trial. *Journal of Dental Research*, 86, pp.125–130.
167. Havenaar R., Huis In't Veld J.H.J. (1992) Probiotics: A General View. In: Wood B.J.B. (eds) *The Lactic Acid Bacteria Volume 1*. Springer, Boston, MA.
168. He, M. and Shi, B. (2017). Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell & Bioscience*, 7(1).
169. He, Z., Wang, Q., Hu, Y., Liang, J., Jiang, Y., Ma, R., Tang, Z. and Huang, Z. (2012). Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, pp.30–35.
170. Hedberg, M., Hasslöf, P., Sjöström, I., Twetman, S. and Stecksén-Blicks, C. (2008). Sugar fermentation in probiotic bacteria--an in vitro study. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(6), pp.482-485.
171. Heng, N., Haji-Ishak, N., Kalyan, A., Wong, A Lovrić, M., Bridson, J., Artamonova, J., Stanton, J., Wescombe, P., Burton, J., Cullinan, M. and Tagg, J. (2011). Genome sequence of the bacteriocin-producing oral probiotic *Streptococcus salivarius* Strain M18. *Journal of bacteriology*, 193(22), 6402-6403.
172. Higuchi, M., Higuchi, M. and Katayose, A. (1982). Identification of PK 1 bacteriophage DNA in *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 61(2), pp.439-441.
173. Hitch, G., Pratten, J. and Taylor, P. (2004). Isolation of bacteriophages from the oral cavity. *Letters in Applied Microbiology*, 39(2), pp.215-219.
174. Hogg, S., Whiley, R. and De Soet, J. (1997). Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1), pp.62-66.
175. Hojsak, I., Snovak, N., Abdović, S., Szajewska, H., Mišak, Z. and Kolaček, S. (2010). *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition*, 29(3), pp.312-316.
176. Holmen, L., Thylstrup, A., Featherstone, J., Fredebo, L. and Shariati, M. (1985). A scanning electron microscopic study of surface changes during development of artificial caries. *Caries Research*, 19(1), pp.11-21.
177. Horst, J. (2018). Silver fluoride as a treatment for dental caries. *Advances in Dental Research*, 29(1), pp.135-140.
178. Horz, H., Meinelt, A., Houben, B. and Conrads, G. (2007). Distribution and persistence of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in the human oral cavity as

- determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(2), pp.126–130.
179. How, K., Song, K. and Chan, K. (2016). *Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Frontiers in Microbiology*, 7, 53.
  180. Hsiao, W., Ung, K., Aeschliman, D., Bryan, J., Finlay, B. and Brinkman, F. (2005). Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands. *PLOS Genetics*, 1(5), e62.
  181. Huang, X., Palmer, S., Ahn, S., Richards, V., Williams, M., Nascimento, M. and Burne, R. (2016). A highly arginolytic streptococcus species that potentially antagonizes *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7), pp.2187-2201.
  182. Huang, X., Schulte, R., Burne, R. and Nascimento, M. (2015). Characterization of the arginolytic microflora provides insights into pH homeostasis in human oral biofilms. *Caries Research*, 49(2), pp.165-176
  183. Hubálek Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), pp.205-29.
  184. Huerta-Cepas, J., Dopazo, J. and Gabaldón, T. (2010). ETE: a python environment for tree exploration. *BMC bioinformatics*, 11, 24. doi:10.1186/1471-2105-11-24
  185. Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-14.
  186. Imfeld, T. and Lutz, F. (1980). Intraplaque acid formation assessed in vivo in children and young adults. *Pediatric Dentistry Journal*, 2, pp.87-93.
  187. Innings, A., Krabbe, M., Ullberg, M. and Herrmann, B. (2005). Identification of 43 *Streptococcus* Species by Pyrosequencing Analysis of the rnpB Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), pp.5983-5991
  188. Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S. and Dousset, X. (2000). Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* susp. *lactis* B14 isolated from boza Bulgarian traditional cereal beverage. *Vestnik Moskovskova Universiteta Kimia*, 41(6), pp.47-53
  189. Jack, R., Tagg, J. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59(2), pp.171-200.
  190. Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A and Wollman, E. (1953). De´finition de quelques termes relatifs a` la lysoge´nie. *Annales de l'Institut Pasteur* (Paris) 84, pp.222–224.
  191. Jacobs, J., Schot, C., Bunschoten, A. and Schouls, L. (1996). Rapid identification of “*Streptococcus milleri*” strains by line blot hybridization: identification of a distinct 16S rRNA population closely related to *Streptococcus constellatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, pp.1717–1721
  192. Jalali, M., Abedi, D., Varshosaz, J., Najjarzadeh, M., Mirlohi, M. and Tavakoli, N. (2012). Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerance* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(1), pp.31-36
  193. Jay, P. and Voorhees, R. (1927) *Bacillus acidophilus* and dental caries. *Dental Cosmos*. (69).pp:977

194. Jayaraman, G., Penders, J. and Burne, R. (1997). Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* hrcA, grpE and dnaK genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Molecular Microbiology*, 25, pp.329–341.
195. Jennings, T.(1999). Lyophilisation—Introduction and basic principles; CRC Press (1837). ASIN: B01NBP6WOL
196. Jensen, A., Scholz, C. and Kilian, M. (2016). Re-evaluation of the taxonomy of the mitis group of the genus *Streptococcus* based on whole genome phylogenetic analyses, and proposed reclassification of *Streptococcus dentisani* as *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* comb. nov., *Streptococcus tigurinus* as *Streptococcus oralis* subsp. *tigurinus* comb. nov., and *Streptococcus oligofermentans* as a later synonym of *Streptococcus cristatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), pp.4803-4820.
197. Jiménez-Díaz, R., Rios-Sanchez, R., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. and Piard, J. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* 196 Grasas y Aceites LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 59(5), pp.1416-1424.
198. Jones, S., Burt, B., Petersen, P. and Lennon M.(2005). The effective use of fluorides in public health. *Bulletin World Health Organization*. (83), pp.670–6
199. Juhas, M., van der Meer, J., Gaillard, M., Harding, R., Hood, D. and Crook, D. (2008). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), pp.376-393.
200. Kachuie, M. and Khoroushi, M. (2017). Prevention and treatment of white spot lesions in orthodontic patients. *Contemporary Clinical Dentistry*, 8(1), p.11.
201. Kang, M., Chung, J., Kim, S., Yang, K. and Oh, J. (2006a). Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Research*, 40(5), pp.418–425.
202. Kang, M., Kim, B., Chung, J., Lee, H. and Oh, J. (2006b). Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(3), pp.226-232.
203. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-66.
204. Kawamura, Y., Hou, X., Sultana, F., Miura, H. and Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(4), pp.882-882.
205. Kawamura, Y., Hou, X., Todome, Y., Sultana, F., Hirose, K., Shu, S., Ezaki, T. and Ohkuni, H. (1998). *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(3), pp.921-927.
206. Kawamura, Y., Shu, S., Whiley, R., Ezaki, T. and Hardie, J. (1999). Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus *Streptococcus*. *Microbiology*, 145(9), pp.2605-2613.
207. Keller, M. and Twetman, S. (2012). Acid production in dental plaque after exposure to probiotic bacteria. *BMC Oral Health*, 12(1).

208. Keller, M., Bardow, A., Jensdottir, T., Lykkeaa, J. and Twetman, S. (2012). Effect of chewing gums containing the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. *Acta Odontologica Scandinavica*, pp.70246–70250.
209. Keyes, P. (1945). Production and inhibition of dental caries in the Syrian hamster. *Journal of Dental Research*. (24),pp.198 (Keyes, 1945).
210. Khalf, M., Dabour, N., Kheadr, E. and Fliss, I. (2010). Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. *Bioresource Technology*, 101(20), pp.7966-72.
211. Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L. S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H. and Sørensen, U. B. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS ONE*, 3(7), e2683. doi:10.1371/journal.pone.0002683
212. Kim, F., Hayes, C., Williams, P., Whitford, G., Joshipura, K., Hoover, R., Douglass, C., Gebhardt, M., Scarborough, M., Gitelis, S., Eckardt, J., Neff, J., Joyce, M., Malawer, M., McGuire, M. and Anderson, H. (2011). An assessment of bone fluoride and osteosarcoma. *Journal of Dental Research*, 90(10), pp.1171-1176.
213. Kirjavainen, P., Salminen, S. and Isolauri, E. (2003). Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 36(2), pp.223-227.
214. Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D., Holo, H., Cintas, L., Snipen, L., Hernández, P., Nes, I. and Diep D. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 157(Pt 12),pp.3256–3267.
215. Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, pp.39–85.
216. Kleerebezem, M. and Vaughan, E. (2009). Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), pp.269-290
217. Klinge, R. (2001). Further observations on tertiary dentin in human deciduous teeth. *Advances in Dental Research*, 15(1), pp.76-79.
218. Kolderman, E., Bettampadi, D., Samarian, D., Dowd, S., Foxman, B., Jakubovics, N. and Rickard, A. (2015). L-Arginine destabilizes oral multi-species biofilm communities developed in human saliva. *PLoS ONE*, 10(5), p.e0121835
219. Kolenbrander, P., Andersen, R., Blehert, D., Eglund, P., Foster, J. and Palmer, R. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 66(3), pp.486-505.
220. Kolenbrander, P., Parrish, K., Andersen, R. and Greenberg, E. (1995). Intergeneric coaggregation of oral *Treponema spp.* with *Fusobacterium spp.* and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium spp.* *Infection and immunity*, 63(12), pp.4584-4588.
221. Konstantinidis, K. and Tiedje, J. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), pp.2567-2572.
222. Koo, H., Xiao, J., Klein, M. I. and Jeon, J. (2010). Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *Journal of bacteriology*, 192(12), pp.3024-3032.

223. Krasse, P., Carlsson, B., Dahl, C., Paulsson, A., Nilsson, A. and Sinkiewicz, G. (2006). Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish Dental Journal*, 30, pp.55–60.
224. Krespi, Y., Shrimme, M. and Kacker, A. (2006). The relationship between oral malodor and volatile sulfur compound-producing bacteria. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 135, pp.671–676.
225. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. and Qi, F. (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology*, 187(21), pp.7193-7203.
226. Küchler, E., Deeley, K., Ho, B., Linkowski, S., Meyer, C., Noel, J., Kouzbari, M., Bezamat, M., Granjeiro, J., Antunes, L., Antunes, L., de Abreu, F., Costa, M., Tannure, P., Seymen, F., Koruyucu, M., Patir, A., Mereb, J., Poletta, F., Castilla, E., Orioli, I., Marazita, M. and Vieira, A. (2013). Genetic mapping of high caries experience on human chromosome 13. *BMC Medical Genetics*, 14(1).
227. Kuhnert, W., Zheng, G., Faustoferri, R. and Quivey, R. (2004). The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *Journal of bacteriology*, 186(24), pp.8524-8528.
228. Kumar R., Brannigan J., Prabhune A., Pundle A., Dodson G., Dodson E. and Suresh, C. (2006). Structural and functional analysis of a conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* reveals an evolutionary relationship with penicillin V acylase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), pp.32516-32525.
229. Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. and Salzberg, S. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome biology*, 5(2), R12.
230. Lai, A., Tran, S. and Simmonds, R. (2002). Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 215(1), pp.133–138.
231. Larbig, K., Christmann, A., Johann, A., Klockgether, J., Hartsch, T., Merkl, R., Wiehlmann, L., Fritz, H. and Tümmler, B. (2002). Gene islands integrated into tRNA (Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *Journal of bacteriology*, 184(23), pp.6665-80.
232. Leber, T and Rottenstein, J. (1878). *Ueber d'caries der Zahn* London: Churchill.
233. Lehner, T., Russell, M. and Caldwell, J. (1980). Immunisation with a purified protein from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *The Lancet*, 315(8176), pp.995-996.
234. Leme, A., Koo, H., Bellato, C., Bedi, G. and Cury, J. (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight. *Journal of Dental Research*, 85(10), pp.878-887.
235. Levy, M. and Leclerc, B. (2012). Fluoride in drinking water and osteosarcoma incidence rates in the continental United States among children and adolescents. *Cancer Epidemiology*, 36(2), pp.e83-e88.
236. Li J, Quinque D, Horz H-P, Li M, Rzhetskaya M, Raff JA, et al. Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiology*, 14, pp.316
237. Liu, X., Vederas, J., Whittall, R., Zheng, J., Stiles, M., Carlson D., Franz, C., McMullen, L. and van Belkum, M. (2011). Identification of an N-terminal

- formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp.5602–5608
238. Liu, Y., Nascimento, M. and Burne, R. (2012). Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *International Journal of Oral Science*, 4(3), pp.135-140.
239. Loesche, W. (1979). Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *Journal of Dental Research*, 58(12), pp.2404-2412.
240. Loesche, W. (1992). The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dental Update Publication*, 19(68), pp.70–72
241. Loesche, W. and Kazor, C. (2002). Microbiology and treatment of halitosis. *Periodontology 2000*, 28(1), pp.256-279.
242. Loesche, W. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiology Reviews*, 50(4), pp.353–380.
243. Loesche, W., Rowan, J., Straffon, L. and Loos, P. (1975). Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infection and Immunity*, 11(6), pp.1252–1260
244. López-López, A., Camelo-Castillo, A., Ferrer, M., Simon-Soro, Á. and Mira, A. (2017). Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: the case of *Streptococcus dentisani*. *Frontiers in Microbiology*, 8.
245. Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R. and Reichmann, P. (2007). Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 189(21), pp.7741–7751
246. Ma, J., M, Hunjan., R, Smith. and T, Lehner. (1989). Specificity of monoclonal antibodies in local passive immunization against *Streptococcus mutans*. *Clinical and Experimental Immunology*, 77(3), pp.331–337
247. MacLean, I. (1927). The Bacteriology of dental caries. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. Section 20(6), pp. 873–878
248. Madureira, A., Brandão, T., Gomes, A., Pintado, M. and Malcata, F. 2011. Technological optimization of manufacture of probiotic whey cheese matrices. *Journal of Food Science*, 76(2), pp.E203-11.
249. Magitot, E. (1878). *Treatise on dental caries. Experimental and therapeutic investigations.* (Translated by T.H. Chandler) Boston. Houghton, Osgood and Company
250. Mahasneh, S. and Mahasneh, A. (2017). Probiotics: A Promising Role in Dental Health. *Dentistry Journal*, 5(4), p.26.
251. Majamaa, H. and Isolauri, E. (1997). Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(2), pp.179-185.
252. Mantzourani, M., Fenlon, M. and Beighton, D. (2009). Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(1), pp.32-37
253. Mantzourani, M., Gilbert, S., Sulong, H., Sheehy, E., Tank, S., Fenlon, M. and Beighton, D. (2009). The isolation of Bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Research*, 43(4), pp.308-313.
254. Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E. and Martínez-Bueno, M. (2008), Genetic features of circular

- bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, pp.2-22.
255. Marsh, P. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research*, 8(2), pp.263-271.
256. Marsh, P. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology*, 149(Pt 2), pp.279-294
257. Marsh, P. (2018). In Sickness and in Health—What does the oral microbiome mean to us? an ecological perspective. *Advances in Dental Research*, 29(1), pp.60-65.
258. Marsh, P., Head, D. and Devine, D. (2015a). Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Research*, 49(1), pp.46-54.
259. Marsh, P., Takahashi, N and Nyvad, B. (2015b). Biofilms in caries development. in O Fejerskov, B Nyvad & E Kidd (eds), *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. Third Edition edn, Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 107-131.
260. Marteau, P. (2001). Safety aspects of probiotic products. *Näringsforskning*, 45:1, pp.22-24.
261. Marteau, P., Pochart, P., Flourié, B., Pellier, P., Santos, L., Desjeux, J. and Rambaud, J. (1990). Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 52(4), pp.685-8.
262. Marthaler, T. (2013). Salt fluoridation and oral health. *Acta Medica Academica*. 42(2), pp.140–55
263. Martinez, R., Aynaou, A., Albrecht, S., Schols, H., De Martinis, E., Zoetendal, E., Venema, K., Saad, S. and Smidt, H. (2011). *In vitro* evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis Bb-12. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), pp.152-8.
264. Martín-Platero, A., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., and Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), pp. 4245-4249.
265. Marttinen, A., Ruas-Madiedo, P., Hidalgo-Cantabrana, C., Saari, M., Ihalin, R. and Söderling, E. (2012). Effects of xylitol on xylitol-sensitive versus xylitol-resistant *Streptococcus mutans* strains in a three-species *in vitro* biofilm. *Current Microbiology*, 65(3), pp.237-243.
266. Mason, M., Nagaraja, H., Camerlengo, T., Joshi, V. and Kumar, P. (2013). Deep sequencing identifies ethnicity-specific bacterial signatures in the oral microbiome. *PLoS ONE*, 8(10), e77287.
267. Masuda, Y., Zendo, T. and Sonomoto, K. (2012). New type of non-lantibiotic bacteriocins: circular and leaderless bacteriocins. *Beneficial microbes*, 3(1), pp.3–12.
268. Maternal xylitol to prevent childhood caries. (2014). *Dental Abstracts*, 59(3), p.e71.
269. Matsui, N., Ito, M., Kuramae, H., Inukai, T., Sakai, A. and Okugawa, M. (2013). Infective endocarditis caused by multidrug-resistant *Streptococcus mitis* in a combined immunocompromised patient: an autopsy case report. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19, pp.321–325.

270. Matsuoka, T., Sugano N., Takigawa, S., Takane, M., Yoshinuma, N., Ito, K. and Koga, Y. (2006). Effect of oral *Lactobacillus salivarius* TI2711 (LS1) administration on periodontopathic bacteria in subgingival plaque. *Journal of the Japanese Society of Periodontology*, 48(4), pp.315–324
271. Mayanagi, G., Kimura, M., Nakaya, S., Hirata, H., Sakamoto, M., Benno, Y. and Shimauchi, H. (2009). Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(6), pp.506–513.
272. McFarland, L., Evans, C. and Goldstein, E. (2018). Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*, 5.
273. McLellan, M and Day, J. (1995). Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction. *Methods in Molecular Biology*, 38, pp.1–5.
274. Mei, M., Ito, L., Cao, Y., Li, Q., Lo, E. and Chu, C. (2013). Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. *Journal of Dentistry*, 41(9), pp.809-817.
275. Meunier, J., Manzanilla, E., Anguita, M., Denis, S., Pérez, J., Gasa, J., Cardot, J., Garcia, F., Moll, X. and Alric, M. (2008). Evaluation of a dynamic in vitro model to simulate the porcine ileal digestion of diets differing in carbohydrate composition. *Journal of Animal Science*, 86(5), pp.1156-1163.
276. Mikx, F., van der Hoeven, J., Plasschaert, A. and König, K. (1976) Establishment and symbiosis of *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* in germfree Osborne-Mendel rats. *Caries Research*, 10, pp.123-132
277. Miller, W. (1890). The micro-organisms of the human mouth: the local and general diseases which are caused by them. Birmingham, Ala.: The Classics of Dentistry Library. Graphische Anstalt Schuler AG. Biel, Switzerland.
278. Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R. and Huis in't Veld, J. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and the small intestine. *Atla- Alternatives to Laboratory Animals*, 23, pp.197–209.
279. Mira, A. (2018). Oral microbiome studies: potential diagnostic and therapeutic implications. *Advances in Dental Research*, 29(1), pp.71-77.
280. Mira, A., Pushker, R., Legault, BA., Moreira, D. and Rodriguez-Valera, F. (2004). Evolutionary relationships of *Fusobacterium nucleatum* based on phylogenetic analysis and comparative genomics. *BioMed Central Evolutionary Biology*. 4: 50.
281. Mira, A., Simón-Soro, A. and Curtis, M. (2017). Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, pp.S23-S38.
282. Miyasawa, H., Iwami, Y., Mayanagi, H. and Takahashi, N. (2003). Xylitol inhibition of anaerobic acid production by *Streptococcus mutans* at various pH levels. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(4), pp.215-219
283. Moncada, G., Maureira, J., Neira, M., Reyes, E., Oliveira Junior, O., Faleiros, S., Palma, P., Corsini, G., Ugalde, C., Gordan, V. and Yevenes, I. (2015). Salivary urease and ads enzymatic activity as endogenous protection against dental caries in children. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 39(4), pp.358-363.

284. Morou-Bermudez, E., Rodriguez, S., Bello, A. and Dominguez-Bello, M. (2015). Urease and dental plaque microbial profiles in children. *PLoS ONE*, 10(9), e0139315.
285. Mühlemann, H., Regolati, B. and Marthaler, T. (1970). The effect on rat fissure caries of xylitol and sorbitol. *Helvetica odontologica acta*, 14(1), pp.48-50.
286. Nascimento, M. (2018). Potential uses of arginine in dentistry. *Advances in Dental Research*, 29(1), pp.98-103.
287. Nascimento, M., Gordan, V., Garvan, C., Browngardt, C. and Burne, R. (2009). Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(2), pp.89-95.
288. Nascimento, M., Liu, Y., Kalra, R., Perry, S., Adewumi, A., Xu, X., Primosch, R. and Burne, R. (2013). Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *Journal of Dental Research*, 92(7), pp.604-608.
289. Nascimento, M., Zaura, E., Mira, A., Takahashi, N. and ten Cate, J. (2017). Second Era of OMICS in caries research: moving past the phase of disillusionment. *Journal of Dental Research*, 96(7), pp.733-740.
290. Nasidze I, Li J, Schroeder R, Creasey JL, Li M, Stoneking M. High diversity of the saliva microbiome in batwa pygmies. *PLoS ONE*, 6(8), e23352.
291. National Toxicology Program. (1990). NTP Toxicology and carcinogenesis studies of sodium fluoride (CAS No. 7681-49-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Drinking Water Studies). *National Toxicology Program Technical Report Series*. (393), pp.1-448
292. Navazesh, M. (1993), Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694, pp.72-77.
293. NIH HMP Working Group, Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C. C., Di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A. R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M. H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B., ... Guyer, M. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome research*, 19(12), 2317-23.
294. Nikawa, H., Makihira, S., Fukushima, H., Nishimura, H., Ozaki, Y., Ishida, K., Darmawan, S., Hamada, T., Hara, K., Matsumoto, A., Takemoto, T. and Aimi, R. (2004). *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), pp.219-223.
295. Nilsen, T., Nes, I. F., and Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(59), pp.2975-2984.
296. Nishihara, T., Suzuki, N., Yoneda, M., and Hirofuji, T. (2014). Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: a randomized open-label clinical trial. *BMC oral health*, 14, 110.
297. Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H. and Kristiansen, P. (2009). Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 2(1), pp.52-60.

298. Nyvad, B. and Fejerskov, O. (1987). Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *European Journal of Oral Sciences*, 95(4), pp.297-307
299. Okwumabua, O., O'Connor, M. and Shull, E. (2003). A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters*, 218(1), pp.79-84.
300. Olivares, M., Díaz-Roperó, M., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Fonollá, J., Navas, M., Rodríguez, J. and Xaus, J. (2007). Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*, 23(3), pp.254-260.
301. Otejen, G and Haseley P. (1999); Freeze-drying. Weinheim: Wiley-VCH.
302. Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K., Pizarro, T. and Cominelli, F. (2009). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), pp.454-459.
303. Paine, R. (1969). A note on trophic complexity and community stability. *The American Naturalist*, 103(929), pp.91-93.
304. Pasteur, L. and Joubert, J. (1877). Charbon et septicémie. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*, 85, pp.101-115.
305. Patir, A., Seymen, F., Yildirim, M., Deeley, K., Cooper, M., Marazita, M. and Vieira, A. (2008). Enamel formation genes are associated with high caries experience in Turkish children. *Caries Research*, 42(5), pp.394-400.
306. Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G. and Gobato, N. (1995). Immune system stimulation by probiotics. *Journal of Dairy Science*, 78(7), pp.1597-1606.
307. Perez, R., Zendo, T. and Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), p.S3.
308. Periasamy, S. and Kolenbrander, P. (2009). Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *Journal of bacteriology*, 191(22), 6804-6811.
309. Petersen, P. and Lennon, M. (2004). Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 32(5), pp.319-321.
310. Peterson, S., Woodhead, J. and Crall, J. (1985). Caries resistance in children with chronic renal failure: plaque pH, salivary pH, and salivary composition. *Pediatric Research*, 19(8), pp.796-799
311. Petersson, L., Pakhomov, G., Twetman, S. and WHO Oral Health Programme. (1997). Fluoride varnish for community-based caries prevention in children. *World Health Organization*. <http://www.who.int/iris/handle/10665/63483>
312. Pham, L., Hoogenkamp, M., Exterkate, R., Terefework, Z., de Soet, J., ten Cate, J., Crielaard, W. and Zaura, E. (2011). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on saliva-derived microcosms. *Archives of Oral Biology*, 56(2), pp.136-147.
313. Pham, L., van Spanning, R., Röling, W., Prosperi, A., Terefework, Z., ten Cate, J., Crielaard, W. and Zaura, E. (2009). Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. *Archives of Oral Biology*, 54(2), pp.132-137.

314. Picard, F., Ke, D., Boudreau, D., Boissinot, M., Huletsky, A., Richard, D., Ouellette, M., Roy, P. and Bergeron, M. (2004). Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), pp.3686-3695
315. Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Gil-Campos, M. and Gil, A. (2018). Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. *Nutrients*, 10(1), p.42.
316. Plonka, K., Pukallus, M., Barnett, A., Walsh, L., Holcombe, T. and Seow, W. (2012). A longitudinal study comparing mutans streptococci and lactobacilli colonisation in dentate children aged 6 to 24 months. *Caries Research*, 46, pp.385–393.
317. Power, D., Burton, J., Chilcott, C., Dawes, P. and Tagg, J. (2008). Preliminary investigations of the colonisation of upper respiratory tract tissues of infants using a paediatric formulation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27, pp.1261–1263.
318. Power, M., Tilman, D., Estes, J., Menge, B., Bond, W., Mills, L., Daily, G., Castilla, J., Lubchenco, J. and Paine, R. (1996). Challenges in the quest for keystones. *BioScience*, 46(8), pp.609-620.
319. Poyart, C., Quesne, G. and Trieu-Cuot, P. (2002). Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of *Streptococcus infantarius* subsp. *colí* as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4), pp.1247-1255.
320. Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P. and Trieu-Cuot, P. (1998). Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *Journal of Clinical Microbiology*, (36), pp.41–47
321. Poyart, C., Quesnes, G. and Trieu-Cuot, P. (2000). Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, (38), pp.415–418
322. Pozharitskaia, M., Morozova, L., Mel' nichuk, G. and Mel' nichuk, S. (1994). The use of the new bacterial biopreparation Acilact in the combined treatment of periodontitis [Article in Russian]. *Stomatologíia (Mosk)*, 73, pp.17–20.
323. Pumarola, A. (1990). *Microbiología y parasitología médica*. España: Salvat.
324. Quivey, R., Faustoferri, R., Monahan, K. and Marquis, R. (2000). Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 189, pp.89–92.
325. Rafiei, M., Kiani, F., Sayehmiri, F., Sayehmiri, K., Sheikhi, A. and Zamanian Azodi, M. (2017). Study of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal diseases: A systematic review and meta-analysis. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, 31, 62.
326. Reichmann, P. and Hakenbeck, R. (2000). Allelic variation in a peptide-inducible two- component system of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, 190, pp.231–236.

327. Reid, G., Younes, J., Van der Mei, H., Gloor, G., Knight, R. and Busscher, H. (2010). Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, 9(1), pp.27-38.
328. Renton, B., Clague, J. and Cooke, R. (2009). *Streptococcus oralis* endocarditis presenting as infective discitis in an edentulous patient. *International Journal of Cardiology*, 137, e13-e14.
329. Rescigno, M. (2001). Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology*, 204(5), pp.572-581.
330. Reyes, E., Martin, J., Moncada, G., Neira, M., Palma, P., Gordan, V., Oyarzo, J. and Yevenes, I. (2014). Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. *Journal of Applied Oral Science*, 22(3), pp.235-240.
331. Riccia, D., Bizzini, F., Perilli, M., Polimeni, A., Trinchieri, V., Amicosante, G. and Cifone, M. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Diseases*, 13(4), pp.376-385.
332. Richter, A., Arruda, A., Peters, M. and Sohn, W. (2011). Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 139(5), pp.657-664.
333. Richter, M. and Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), pp.19126-19131.
334. Ritthagol, W., Saetang, C. and Teanpaisan, R. (2014). Effect of probiotics containing *Lactobacillus paracasei* SD1 on salivary mutans Streptococci and Lactobacilli in orthodontic cleft patients: a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 51(3), pp.257-263.
335. Robertson, W. (1842). *A practical treatise on the human teeth*. London: Churchill.
336. Rosenberg, M. (1996). Clinical assessment of bad breath: current concepts. *The Journal of the American Dental Association*, 127(4), pp.475-482.
337. Rosier, B., De Jager, M., Zaura, E. and Krom, B. (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 92.
338. Rosier, B., Marsh, P. and Mira, A. (2017). Resilience of the oral microbiota in health: mechanisms that prevent dysbiosis. *Journal of Dental Research*, 97(4), pp.371-380.
339. Ross, R., Morgan, S. and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1), pp.3-16.
340. Rugg-Gunn, A., Edgar, W., Geddes, D. and Jenkins, G. (1975). The effect of different meal patterns upon plaque pH in human subjects. *British Dental Journal*, 139(9), pp.351-356.
341. Runarsson, A. (2009). Changes in the oral microflora of occlusal surfaces of teeth with the onset of dental caries. PhD thesis. *University of Iceland, Faculty of Odontology*.
342. Ruoff, K., Miller, S., Garner, C., Ferraro, M. and Calderwood, S. (1989). Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, (27), pp.305-308

343. Saha, S., Tomaro-Duchesneau, C., Tabrizian, M. and Prakash, S. (2012). Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(9), pp.1207-1220.
344. Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. and Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics -A review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), pp.93-106.
345. Sanchez, B., Urdaci, M. and Margolles, A. (2010). Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology*, 156(11), pp.3232-3242
346. Sansonetti, P. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology*, 4(12), pp.953-964
347. Santarpiia, P., Lavender, S., Gittins, E., Vandeven, M., Cummins, D., and Sullivan, R. (2014). A 12-week clinical study assessing the clinical effects on plaque metabolism of a dentifrice containing 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and 1,450 ppm fluoride. *American Journal of Dentistry*. 27, 100–105
348. Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S. and Black, R. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(6), pp.374-382.
349. Schaumann, S., Staufienbiel, I., Scherer, R., Schilhabel, M., Winkel, A., Stumpp, S., Eberhard, J. and Stiesch, M. (2014). Pyrosequencing of supra- and subgingival biofilms from inflamed peri-implant and periodontal sites. *BMC Oral Health*, 14 pp.157.
350. Schiffrin, E., Parlesak, A., Bode, C., Christian Bode, J., van't Hof, M., Grathwohl, D. and Guigoz, Y. (2008). Probiotic yogurt in the elderly with intestinal bacterial overgrowth: endotoxaemia and innate immune functions. *British Journal of Nutrition*, 101(07), p.961.
351. Schmidt, H. and Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), pp.14-56.
352. Scully, C., El-Maaytah, M., Porter, S. and Greenman, J. (1997). Breath odor: etiopathogenesis, assessment and management. *European Journal of Oral Sciences*, 105(4), pp.287-293.
353. Shah, A., Shetty, P., Ramachandra, C., Bhat, N. and Laxmikanth, S. (2011). *In vitro* assessment of photocatalytic titanium oxide surface modified stainless steel orthodontic brackets for antiadherent and antibacterial properties against *Lactobacillus acidophilus*. *The Angle Orthodontist*, 81(6), pp.1028-1035.
354. Sharma, S., Lavender, S., Woo, J., Guo, L., Shi, W., Kilpatrick-Liverman, L. and Gimzewski, J. (2014). Nanoscale characterization of effect of L-arginine on *Streptococcus mutans* biofilm adhesion by atomic force microscopy. *Microbiology*, 160(Pt\_7), pp.1466-1473.
355. Sheih, Y., Chiang, B., Wang, L., Liao, C. and Gill, H. (2001). Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(2), pp.149-156.
356. Shimauchi, H., Mayanagi, G., Nakaya, S., Minamibuchi, M., Ito, Y., Yamaki, K. and Hirata, H. (2008). Improvement of periodontal condition by probiotics with

- Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(10), pp.897-905.
357. Shu, M., Morou-Bermudez, E., Suárez-Pérez, E., Rivera-Miranda, C., Browngardt, C., Chen, Y., Magnusson, I. and Burne, R. (2007). The relationship between dental caries status and dental plaque urease activity. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(1), pp.61-66.
358. Simón-Soro, A. and Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, 23(2), pp.76-82.
359. Simón-Soro, Á., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Alcaraz, L. and Mira, A. (2013). A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Research*, 47(6), pp.591-600.
360. Simón-Soro, A., Guillen-Navarro, M. and Mira, A. (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 6(1), p.25443.
361. Simón-Soro, Á., Tomás, I., Cabrera-Rubio, R., Catalan, M., Nyvad, B. and Mira, A. (2013). Microbial geography of the oral cavity. *Journal of Dental Research*, 92(7), pp.616-621.
362. Sivapathasundharam B, Raghu AR. Sivapathasundharam B, Rajendran R.(2009). Shafer's Textbook of Oral Pathology. 6th ed. Noida, India: Elsevier Publications; pp. 438–43.
363. Smith, D. (2002). Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(4), pp.335-349.
364. Socransky, S. (1977). Microbiology of periodontal disease—present status and future considerations. *Journal of Periodontology*, 48(9), pp.497-504.
365. Söderling, E., Isokangas, P., Pienihäkkinen, K., Tenovu, J. and Alanen, P. (2001). Influence of maternal xylitol consumption on mother–child transmission of mutans Streptococci: 6–Year Follow–Up. *Caries Research*, 35(3), pp.173-177.
366. Sookkhee, S., Chulasiri, M. and Prachyabrued, W. (2001). Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), pp.172-179.
367. Stanley, H., Pereira, J., Spiegel, E., Broom, C. and Schultz, M. (1983). The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 12(4), pp.257-289.
368. Stecksén-Blicks, C., Sjöström, I. and Twetman S. (2009). Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries Research*, 43(5), pp.374-381.
369. Stensson, M., Koch, G., Coric, S., Abrahamsson, T., Jenmalm, M., Birkhed, D. and Wendt, L.(2014). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age. *Caries Research*, 48(2), pp.111–7.
370. Stephan, R. (1944). Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. *Journal of Dental Research*, 23(4), pp.257-266.

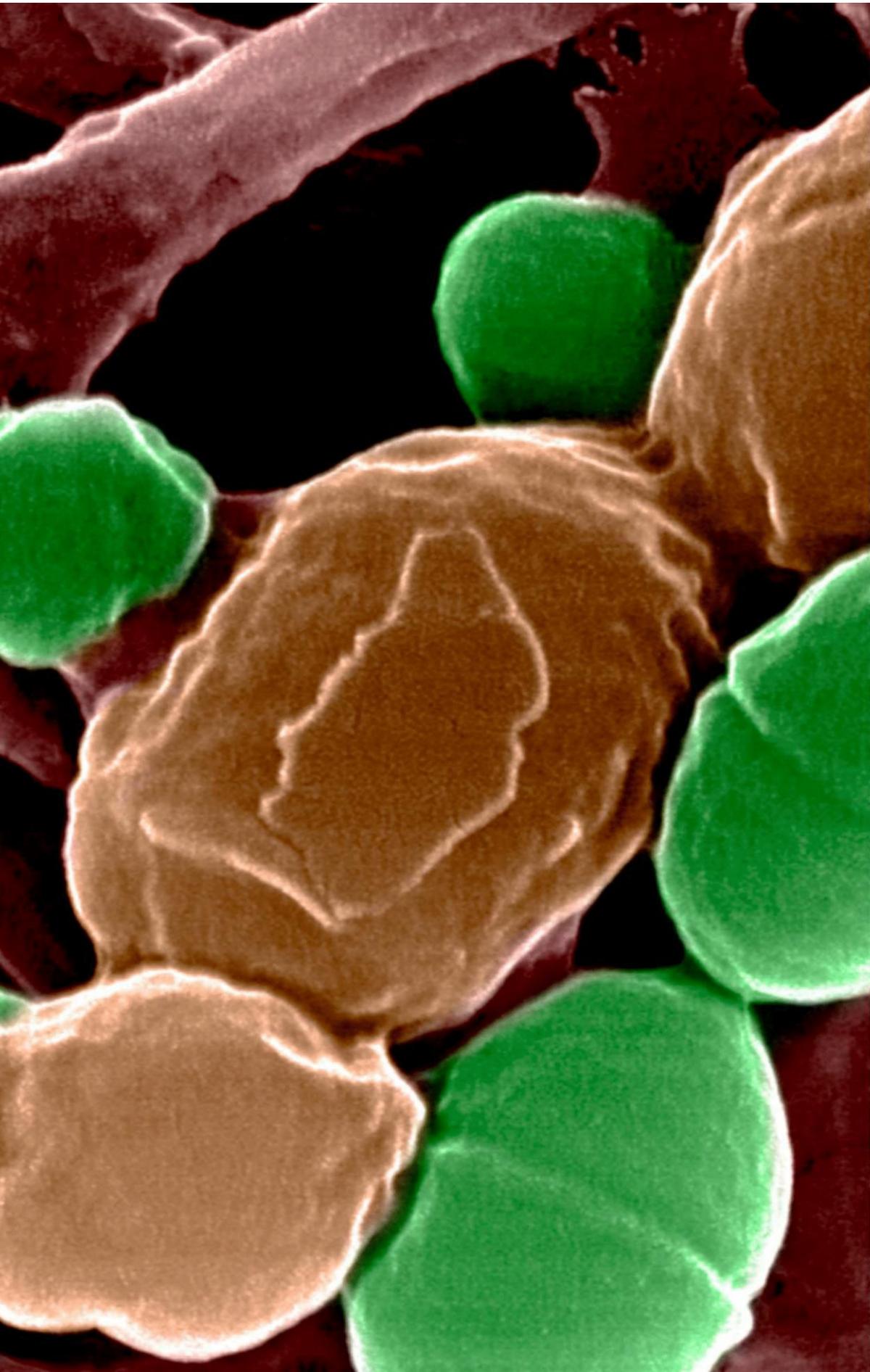
371. Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H. and Nes, I. (1992). Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a Carnobacterium sp. *Applied and environmental microbiology*, 58(5), pp.1417-1422.
372. Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C. and Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *The Journal of Immunology*, 159(4), pp.1739-45
373. Sullivan, J., Trzebiatowski, J., Cruickshank, R., Gouzy, J., Brown, S., Elliot, R., Fleetwood, D., McCallum, N., Rossbach, U., Stuart, G., Weaver, J., Webby, R., De Bruijn, F. and Ronson, C. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Journal of bacteriology*, 184(11), pp.3086-3095.
374. Suzuki, N., Yoneda, M., Tanabe, K., Fujimoto, A., Iha, K., Seno, K., Yamada, K., Iwamoto, T., Masuo, Y. and Hirofujii, T. (2014). *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets for the treatment of oral malodor: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 117(4), pp.462-470
375. Tagg, J. (1992) Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria: An Opinion Regarding their Nature, Nomenclature and Numbers. In: James R., Lazdunski C., Pattus F. (eds) Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 65. Springer, Berlin, Heidelberg
376. Tagg, J. and Dierksen, K. (2003). Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. *Trends in Biotechnology*, 21(5), pp.217-223.
377. Takahashi, N. and Nyvad, B. (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Research*, 42(6), pp.409-418.
378. Takahashi, N. and Nyvad, B. (2010). The role of bacteria in the caries process. *Journal of Dental Research*, 90(3), pp.294-303.
379. Takahashi, N. and Washio, J. (2011). Metabolomic effects of xylitol and fluoride on plaque biofilm in vivo. *Journal of Dental Research*, 90(12), pp.1463-1468.
380. Takahashi, T. and Morotomi, M. (1994). Absence of cholic acid 7 $\alpha$ -dehydroxylase activity in the strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Journal of Dairy Science*, 77(11), pp.3275-3286
381. Tanner, A., Mathney, J., Kent, R., Chalmers, N., Hughes, C., Loo, C., Pradhan, N., Kanasi, E., Hwang, J., Dahlan, M., Papadopoulou, E. and Dewhirst, F. (2011). Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), pp.1464-1474.
382. Taubman, M. and Nash, D. (2006). The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nature Reviews Immunology*, 6(7), pp.555-563.
383. ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. and Huis in't Veld, J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, pp.73-84
384. ten Cate, J. (2009). The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Advances in Dental Research*, 21(1), pp.8-12.
385. Teng, L., Hsueh, P., Tsai, J., Chen, P., Hsu, J., Lai, H., Lee, C. and Ho, S. (2002). groESL Sequence determination, phylogenetic analysis, and species differentiation for viridans group Streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), pp.3172-3178.

386. Theilade, E. (1986). The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(10), pp.905-911.
387. Thomas, L., Veysey, M., Bathgate, T., King, A., French, G., Smeeton, N., Murphy, G. and Dowling, R. (2000). Mechanism for the transit-induced increase in colonic deoxycholic acid formation in cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology*, 119(3), pp.806-15.
388. Thomas, L., Veysey, M., Murphy, G. and Dowling, R. (2001). Influence of pH on the phase distribution of nascent deoxycholic acid in fresh human cecal aspirates. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(2), pp.G371-4.
389. Tomes, J. and Tomes, C. (1897). *A system of dental surgery*. London: J. & A. Churchill.
390. Tong, H., Gao, X. and Dong, X. (2003). *Streptococcus oligofermentans* sp. nov., a novel oral isolate from caries-free humans. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 53(4), pp.1101-1104.
391. Torlakovic, L., Klepac-Ceraj, V., Ogaard, B., Cotton, S., Paster, B. and Olsen, I. (2012). Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *Journal of Oral Microbiology*, 4, 10.3402/jom.v4i0.16125.
392. Townsend, G., Richards, L., Hughes, T., Pinkerton, S. and Schwerdt, W. (2003). The value of twins in dental research. *Australian Dental Journal*, 48(2), pp.82-88.
393. Trahan, L., Néron, S. and Bareil, M. (1991). Intracellular xylitol-phosphate hydrolysis and efflux of xylitol in *Streptococcus sobrinus*. *Oral Microbiology and Immunology*, 6(1), pp.41-50.
394. U.S. Federal Register (U.S. Food and Drug Administration) Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. 21 CFR Part 184, Fed Reg.1988;53:11247-11251
395. Underwood, A. and Milles, W. (1881). An investigation into the effects of organisms upon the teeth and alveolar portions of the jaws. *Transactions of the International Medical Congress*, London, UK.
396. van der Hoeven, J., Mikx, F., König, K. and Plasschaert, A. (1974). Plaque formation and dental caries in gnotobiotic and spf osborne-mendel rats associated with *Actinomyces viscosus*. *Caries Research*, 8(3), pp.211-223.
397. van der Ploeg, J. (2007). Genome sequence of *Streptococcus mutans* bacteriophage M102. *FEMS Microbiology Letters*, 275(1), pp.130-138.
398. van Heel, A., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J. and Kuipers, O. (2013). BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), pp.W448-W453.
399. van Wuyckhuysse, B., Perinpanayagam, H., Bevacqua, D., Raubertas, R., Billings, R., Bowen, W. and Tabak, L. (1995). Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. *Journal of Dental Research*, 74, pp.686-690.
400. Vanderhoof, J., Whitney, D., Antonson, D., Hanner, T., Lupo, J. and Young, R. (1999). *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *The Journal of Pediatrics*, 135(5), pp.564-568.

401. Vecchione, A., Celandroni, F., Mazzantini, D., Senesi, S., Lupetti, A. and Ghelardi, E. (2018). Compositional quality and potential gastrointestinal behavior of probiotic products commercialized in Italy. *Frontiers in Medicine*, 5, 59.
402. Veysey, M., Thomas, L., Mallet, A., Jenkins, P., Besser, G., Murphy, G. and Dowling, R. (2001). Colonic transit influences deoxycholic acid kinetics. *Gastroenterology*, 121(4), pp.812-22
403. Viljanen, M., Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T. and Kuitunen, M. (2005). Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy*, 60(4), pp.494-500.
404. Volozhin, A., Il'in, V., Maksimovskii, IuM., Sidorenko, A., Istranov, L., Tsarev, V., Istranova, E. and Aboiants, R. (2004). Development and use of periodontal dressing of collagen and *Lactobacillus casei* 37 cell suspension in combined treatment of periodontal disease of inflammatory origin (a microbiological study) [Article in Russian]. *Stomatologiya (Mosk)*, 83, pp.6–8.
405. Walsh, T., Oliveira-Neto, J. and Moore, D. (2015). Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
406. Wan, A., Seow, W., Purdie, D., Bird, P., Walsh, L. and Tudehope, D. (2001). Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old preterm infants. *Journal of Dental Research*, 80(12), pp.2060-2065
407. Wei, G. (2006). Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), pp.1100-1109.
408. Wendell, S., Wang, X., Brown, M., Cooper, M., DeSensi, R., Weyant, R., Crout, R., McNeil, D. and Marazita, M. (2010). Taste genes associated with dental caries. *Journal of Dental Research*, 89(11), pp.1198-1202.
409. Wescombe, P., Burton, J., Cadieux, P., Klesse, N., Hyink, O., Heng, N., Chilcott, C., Reid, G. and Tagg, J. (2006). Megaplasmids encode differing combinations of lantibiotics in *Streptococcus salivarius*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(3), pp.269-280.
410. Wescombe, P., Heng, N., Burton, J., Chilcott, C. and Tagg, J. (2009). Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Microbiology*, 4(7), pp.819-835.
411. Wescombe, P., Upton, M., Renault, P., Wirawan, R., Power, D., Burton, J., Chilcott, C. and Tagg, J. (2011). Salivaricin 9, a new lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius*. *Microbiology*, 157(5), pp.1290-1299.
412. Westling, K. (2005). Viridans group streptococci septicaemia and endocarditis: molecular diagnostics, antibiotic susceptibility and clinical aspects: Institutionen för medicin/Department of Medicine/Thesis
413. Willcox, M., Drucker, D. and Green, R. (1987). Relative cariogenicity and in-vivo plaque-forming ability of the bacterium *Streptococcus oralis* in gnotobiotic WAG/RIJ rats. *Archives of Oral Biology*, 32(6), pp.455-457.
414. Wolff, M., Corby, P., Klaczany, G., Santarpia, P., Lavender, S., Gittins, E., Vandeven, M., Cummins, D. and Sullivan, R. (2013). *In Vivo* effects of a new dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride on plaque metabolism. *Journal of Clinical Dentistry*, 24 (Spec Iss A), pp.A45-A54

415. World Health Organization [WHO] (1997). *Oral Health Surveys: Basic Methods*. Geneva: World Health Organization.
416. Xu, H., Hao, W., Zhou, Q., Wang, W., Xia, Z., Liu, C., Chen, X., Qin, M. and Chen, F. (2014). Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without caries prior to eruption of second primary molars. *PLoS ONE*, 9(2), e89269.
417. Xu, X., He, J., Xue, J., Wang, Y., Li, K., Zhang, K., Guo, Q., Liu, X., Zhou, Y., Cheng, L., Li, M., Li, Y., Li, Y., Shi, W. and Zhou, X. (2015). Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environmental Microbiology*, 17, pp.699–710.
418. Yamanaka, W., Takeshita, T., Shibata, Y., Matsuo, K., Eshima, N., Yokoyama, T. and Yamashita, Y. (2012). Compositional stability of a salivary bacterial population against supragingival microbiota shift following periodontal therapy. *PLoS ONE*, 7(8), e42806.
419. Yang, R., Johnson, M. and Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 58(10), pp.3355-3359.
420. Zahradnik, R., Magnusson, I., Walker, C., McDonell, E., Hillman, C. and Hillman, J. (2009). Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3™, a probiotic mouthwash. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), pp.682-690.
421. Zaura, E., Keijser, B., Huse, S. and Crielaard, W. (2009). Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiology*, 9(1), p.259.
422. Zbinden, A., Mueller, N., Tarr, P., Eich, G., Schulthess, B., Bahlmann, A., Keller, P. and Bloemberg, G. (2012). *Streptococcus tigurinus*, a novel member of the *Streptococcus mitis* group, causes invasive infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, pp.2969–2973.
423. Zeng, L. and Burne, R. (2012). comprehensive mutational analysis of sucrose-metabolizing pathways in *Streptococcus mutans* reveals novel roles for the sucrose phosphotransferase system permease. *Journal of Bacteriology*, 195(4), pp.833-843
424. Zhi, Q., Lo, E. and Kwok, A. (2013). An *in vitro* study of silver and fluoride ions on remineralization of demineralized enamel and dentine. *Australian Dental Journal*, 58(1), pp.50-56
425. Zhu, L. and Kreth, J. (2012). The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 717843.





TESIS DOCTORAL