

TESIS DE DOCTORADO

**NUEVOS ANTIPATOGÉNICOS:
IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS
BACTERIAS MARINAS CON ACTIVIDAD
QUORUM QUENCHING Y APLICACIÓN
EN SALUD BUCODENTAL**

Andrea Muras Mora

ESCUELA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGIA MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Nuevos antipatogénicos: identificación de nuevas bacterias marinas con actividad *quorum quenching* y aplicación en salud bucodental

D./Dna. Andrea Muras Mora

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 31 de maio de 2019

Asdo.....



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Nuevos antipatogénicos: identificación de nuevas bacterias marinas con actividad *quorum quenching* y aplicación en salud bucodental

D./Dna. Ana Maria Otero Casal

INFORMA/N:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. **Andrea Muras Mora**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

En Santiago de Compostela., 31 de maio de 2019

Asdo.....



Agradecimientos

He tenido la suerte de que durante todos estos años de tesis se han cruzado en mi camino personas increíbles que me han ayudado un montón tanto a nivel profesional como personal, por lo que me gustaría darles las gracias.

Primero de todo, agradecerle a mi directora Ana María Otero Casal la gran oportunidad que ha sido para mí formar parte de su grupo de investigación que siempre ha sido como una segunda familia. Gracias por enseñarme tantísimo y por permitirme trabajar en algo que me encanta. Por toda su dedicación y su ayuda en todas las ocasiones en las que lo he necesitado.

I would like to thank Profs. Bastiaan Krom and Prof. Yehuda Benayahu for giving me the opportunity of taking part of their research groups at the Academish Centrum Tanheelkunde Amsterdam (ACTA) and the Interuniversity Institute for Marine Science (Eilat, Israel), respectively. I would also like to thank the Chinese girls group from ACTA for the good company during my visit.

Agradecer a Vanessa Blanc y a Rubén León de la empresa Dentaaid por permitirme aprender el cultivo de patógenos orales en sus instalaciones y su colaboración cediéndonos cepas, cultivos y colutorios para la realización de este trabajo.

Agradecer también la participación en este trabajo de Tamara Camino, Lucia García, Jaime Amaro, Iris Gestoso y Ana Parga mientras realizaban sus Trabajos Fin de Grado y Trabajo Fin de Máster.

Gracias a toda la gente que ha pasado por el laboratorio durante estos años y de los que siempre he aprendido algo (Sarah, Sam, Simón, Vania, Marina, Albert, Fairouz). A Pedro, Hugo e Isa, por los buenos momentos juntos que han sido muchos. A Ana Parga, reciente adquisición del grupo, que siempre está dispuesta para echar un mano en lo que haga falta. A Maribel, por su apoyo incondicional en cualquier faceta de la vida. A Manuel, por siempre poder contar con el en caso necesario, por todas sus explicaciones y su ayuda dentro y fuera del laboratorio. A Celia, por su compañía, sus consejos y su apoyo en el laboratorio, pero especialmente por todo lo vivido (que ha sido mucho) durante estos años.

Gracias a los, aunque fuera del laboratorio, también me han tenido que aguantar a mí y a mi tesis durante todos estos años. A María (farmacia), la mejor compañera de piso del mundo mundial. A Vanesa y a Saul porque llevan ahí un montón de años ya. A María (la de las lentillas) aunque acaba de llegar su intensidad siempre es bien recibida.

Gracias a la gente de FameLab y de Hablando de Ciencia que me han animado tanto en los últimos meses cuando todo se hacia un poco cuesta arriba. Porque me han devuelto la ilusión y me han dado ganas de convencer al mundo de que las bacterias molan mucho.

Quiero agradecerles a mis chicos natatorios su apoyo siempre incondicional. Por supuesto también quiero darle las gracias a Juan por estar ahí siempre y a mi familia por creer en mí más que yo misma.

Por último, pero no menos importante, gracias a toda la gente que he conocido, aunque no la haya nombrado. También gracias a ti que estás a punto de leer este trabajo, espero que de alguna forma pueda contribuir al tuyo.



El trabajo contenido en esta memoria ha sido parcialmente financiado por “Axudas de apoio á etapa predoutoral do Plan Galego de Investigación, Innovación e Crecemento 2011-2015 (PlanI2C) ano 2014” da Xunta de Galicia (ED481A-2015/311) y por el proyecto titulado “Probióticos de origen marino con efecto *quorum quenching* para el control de enfermedades infecciosas en sanidad veterinaria” de la Fundación Ramón Areces. La estancia de investigación predoctoral ha sido financiada por el premio a la mejor investigación aplicada otorgado por la “Real Academia Galega de Ciencias” (RAGC) y la “Axencia Galega de Innovación” (GAIN).

La doctoranda declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.





ABREVIATURAS

AAA	<i>Active Attachment Amsterdam model</i>
AB	Medio de <i>Agrobacterium</i>
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADNe	Ácido desoxirribonucleico extracelular
AHL	<i>N</i> -acilhomoserín lactona
AI	Autoinductor
aiiA	<i>AutoInducer Inactivator</i>
AIP	Péptido autoinductor
AM 1/100	Agar marino diluido 1/100
AM	Agar marino
AMCC	<i>Artificial mouth computer controlled</i>
BB	Medio de bioensayo de bioluminiscencia
BHI	Medio infusión cerebro corazón
BHIs	Medio BHI suplementado con sacarosa
BHI-2	Medio infusión cerebro corazón suplementado
BHIA	Medio infusión cerebro corazón agar
BPW	Agua de peptona tamponada
CDC	Reactor de biopelícula del <i>center for disease control</i>
CDFE	<i>Constant depth film fermenter</i>
CDPs	Dipéptidos cíclicos
Chase	Familia cisteína hidrolasas
Chl-a	Clorofila a
CHX	Clorhexidina
CI	Índice celular
CLSM	Microscopía de epifluorescencia y confocal
CM	Caldo marino
CPW	Agua de cisteína y peptona
CSP	Péptido estimulador de la competencia
DM-MCE	Extracto en metanol y diclorometano
DSF	Factor señal difusible
EA-PCE	Extracto celular purificado en acetato de etilo

ANDREA MURAS MORA

FAS	Agua de mar filtrada y autoclavada
FAS-POL	Agua de mar filtrada y autoclavada suplementada con polímeros
FCS	Suero fetal bovino
FR	Fluorescencia relativa
FRET	Ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GOS	Colección de metagenomas marinos de océano
HMP	Proyecto Microbioma Humana
HSL	Anillo lactona
IQS	Inhibidores de QS
LB	Medio Luria-Bertani
MAM	<i>Multiplaque artificial mouth</i>
MB	Medio McBain
MBL	Superfamilia de las metalo- β -lactamasas
MCE	Extracto celular de metanol
MSCBM	<i>Multi-station continuous-culture biofilm model</i>
OTU	Unidad operacional taxonómica
PCA	Análisis de componentes principales
PCE	Extracto celular purificado
PCE20J	PCE de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J
PCETm	PCE de <i>Tenacibaculum maritimum</i>
POC	Carbono orgánico particulado
PON	Paroxonasa
PQS	Señal quinolona de <i>Pseudomonas</i>
PTE	Familia de las fostriesteresas
QQ	Quorum quenching
QS	Quorum sensing
SAM	S-adenosilmetionina
SCH	Medio Schaedler
TBS	Tampón Tris salino
TSA-b	Agar de triptona y soja con sangre
TSA-I	Agar de triptona y soja con 1% de NaCl
UFC	Unidades formadoras de colonias
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopirósido



ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. Relevancia de la salud bucodental	3
2. Biopelícula oral o placa dental.....	6
2.1 Caries dental	10
2.1 Enfermedad periodontal.....	11
3. <i>Quorum sensing</i>	13
4. <i>Quorum quenching</i>	19
4.1 Antagonistas de moléculas de <i>quorum sensing</i>	21
4.2 Degradación enzimática de moléculas de <i>quorum sensing</i>	22
5. Aplicaciones biotecnológicas del <i>quorum quenching</i>	28
5.1 Uso de compuestos con actividad <i>quorum quenching</i> en salud bucodental	31
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Cepas y medios de cultivo empleados	39
1.1 Cepas marinas	39
1.2 Cepas orales	39
1.3 Bacterias biosensoras	39
1.4 Formación de biopelículas	39
2. Aislamiento y cuantificación de bacterias cultivables	40
2.1 Muestras de agua de mar.....	40
2.2 Muestras de saliva y placa dental.....	40
3. Recogida de muestras orales para análisis de AHLs.....	41
3.1 Protocolo de toma de muestras de individuos	41
3.2 Muestras para la identificación del perfil de AHLs	41
3.3 Muestras para la formación de biopelícula	41
4. Detección de moléculas tipo AHLs	41
4.1 Cribado mediante una bacteria biosensora	41
5. Identificación del perfil de AHLs mediante HPLC-MS	42
6. Actividad <i>quorum quenching</i> contra AHLs	43
7. Actividad <i>quorum quenching</i> contra AI-2 y caracterización	44
8. Purificación de la enzima Aii20J y comprobación de actividad	45
9. Estabilidad de la enzima Aii20J.....	46
10. Formación de biopelícula.....	46
10.1 Sistemas clásicos.....	46

10.2 xCELLigence System RTCA ®.....	46
10.3 Sistema de adhesión activa de Ámsterdam.....	48
10.4 Modelo de adhesión activa	48
11. Caracterización fenotípica de biopelículas orales	49
11.1 Cuantificación de unidades formadoras de colonias.....	49
11.2 Acumulación de ácido láctico.....	49
11.3 Actividad proteasa	49
11.4 Cuantificación de biomasa.....	50
12. Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano.....	50
13. Diversidad microbiana de bacterias cultivables marinas e identificación de aislados	50
14. Análisis metagenómico de las muestras marinas	51
15. Análisis de genomas y metagenomas orales.....	51
16. Análisis de la composición bacteriana de las biopelículas cultivadas in vitro	52
16.1 Efecto de la adición de AHLs en la composición de la población.....	52
16.2 Efecto de la adición de Aii20J en la composición bacteriana.....	52
17. Análisis estadístico	53
17.1 Muestras marinas	53
17.2 Muestras de biopelícula de <i>S. mutans</i>	53
17.3 Muestras efecto adición de AHLs exógenas.....	53
17.4 Muestras efecto de Aii20J sobre biopelícula oral.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
CAPÍTULO 1: PREVALENCIA DEL <i>QUORUM SENSING</i> EN EL MAR MEDITERRÁNEO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD <i>QUORUM QUENCHING</i>	57
Antecedentes	57
Resultados	59
1. Aislamiento y crecimiento bacteriano.....	59
2. Diversidad taxonómica de las cepas cultivables	59
3. Quorum sensing y quorum quenching en bacterias marinas cultivables	61
4. Identificación de las cepas con actividad <i>quorum quenching</i> de alto espectro y caracterización de dicha actividad.....	63
5. Identificación y sobre-expresión de genes de <i>quorum quenching</i> de las bacterias cultivables aisladas	64
6. Genes de <i>quorum sensing</i> y <i>quorum quenching</i> en muestras metagenómicas	65
Discusión.....	66

CAPÍTULO 2. INTERFERENCIA CON EL SISTEMA AI-2 PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE LA PLACA DENTAL CARIOGÉNICA 73

Antecedentes	73
Resultados	75
1. Interferencia del extracto de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J con el sistema mediado por la señal AI-2	75
2. Efecto de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J sobre la formación de biopelícula	76
3. Efecto del medio de cultivo en la inhibición de la biopelícula	78
4. Validación de los resultados del xCELLigence®	79
5. Efecto del extracto celular de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J sobre otros <i>Streptococcus</i>	81
6. Efecto del extracto celular de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J sobre muestras de saliva.....	82
7. Caracterización del compuesto bioactivo de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J	83
Discusión.....	85

CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN DE SEÑALES TIPO ACIL-HOMOSERIN-LACTONA EN MUESTRAS Y BACTERIAS ORALES 89

Antecedentes	89
Resultados	91
1. Presencia de AHLs en muestras orales	91
2. Aislamiento de bacterias de saliva y placa dental	93
3. Producción de AHLs en bacterias cultivables de saliva y placa dental	94
4. Producción de AHLs en biopelículas orales mixtas.....	95
5. Producción de AHLs en bacterias patógenas	96
6. Identificación de genes de <i>quorum sensing</i> y <i>quorum quenching</i> en genomas y metagenomas orales.....	97
Discusión.....	103

CAPÍTULO 4. EFECTO DE LA ADICIÓN DE ACIL-HOMOSERIN LACTONAS EN BIOPELÍCULAS ORALES 109

Antecedentes	109
Resultados	111
1. Efecto de la adición de AHLs sobre la formación biopelícula oral	111
2. Efecto de la adición de AHLs sobre la producción de ácido láctico.....	112
3. Efecto de la adición de AHLs sobre la actividad proteasa.....	114
4. Efecto de la adición de AHLs sobre la composición microbiana	114
Discusión.....	117

CAPÍTULO 5. USO DE Aii20J PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE PLACA DENTAL 121

Antecedentes	121
--------------------	-----

Resultados	123
1. Formación de biopelícula en el sistema xCELLigence®.....	123
1.1 Optimización del inóculo y del medio de cultivo	124
1.2 Efecto de Aii20J sobre distintos tipos de salivas clínicas.....	127
1.3 Comparación de la inhibición de Aii20J con la actividad de colutorios bucales comerciales	128
2. Formación de biopelícula en el sistema adherencia activa	130
2.1 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la respuesta a Aii20J.....	133
2.2 Optimización del tiempo de incubación	135
2.3 Efecto de Aii20J sobre distintas biopelículas clínicas	137
3. Comparación del efecto de Aii20J sobre una biopelícula sana y una biopelícula periodontal	138
4. Caracterización del efecto de Aii20J sobre la formación y composición bacteriana de biopelícula sana	141
Discusión.....	154
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	161
RESUMEN/RESUMO/SUMMARY	167
BIBLIOGRAFÍA	181
ANEXO. Publicaciones derivadas de la tesis	213



INTRODUCCIÓN



1. Relevancia de la salud bucodental

En los últimos años se ha producido una concienciación de la importancia de la **salud bucodental** como componente de la salud general y factor influyente en el bienestar y en la calidad de vida. Las enfermedades bucodentales son las patologías no transmisibles más comunes, siendo sus efectos en términos de molestias, dolor, deterioro funcional y disminución de la calidad de vida, considerables. Su tratamiento es muy costoso, significando el 5% del gasto total en salud y el 20% del gasto medio directo en salud. Las enfermedades bucodentales son, por lo tanto, la cuarta patología más cara de tratar a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que en el mundo entre el 60%-90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental (OMS, 2012), estando considerada pandemia en los países industrializados. Entre los escolares gallegos, la prevalencia de la caries a los 6 años es del 28,6% mientras que a los 12 años ya alcanza el 57,7% (BEG, 2011). Por otro lado, la enfermedad periodontal, que es la principal causa de pérdida de piezas dentales en adultos, es muy común en fases iniciales mientras que en fases avanzadas (periodontitis grave) afecta entre el 15% y el 20% de los adultos de edades comprendidas entre los 35 y 44 años (OMS, 2012). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la prevalencia de estas enfermedades también varía dependiendo de la región geográfica y de los recursos disponibles para su prevención y tratamiento. Existen ciertos factores de riesgo comportamentales, comunes a otras importantes enfermedades no transmisibles, como son una dieta rica en azúcares o el consumo de tabaco y/o alcohol. Dado que la prevalencia de la enfermedad periodontal se incrementa con la edad, el envejecimiento generalizado que se está produciendo en la población hará que crezca la incidencia de estos problemas. Además, las enfermedades orales son también factores de riesgo en otras importantes patologías como enfermedades cardiovasculares, cáncer oral y de páncreas. Incluso algunas infecciones bacterianas como la rinosinusitis, la diarrea o la vaginosis bacteriana pueden comenzar en la cavidad oral (Simón-Soro y Mira, 2015). Por lo tanto, es esencial un mejor conocimiento del ecosistema bucal y las relaciones entre los microorganismos que lo habitan, no solo para entender como se desarrollan las enfermedades bacterianas orales sino también para comprender como diferentes patologías como el Alzheimer o incluso el cáncer (Sampaio-Maia et al., 2016; Pritchard et al., 2017), están influenciadas por la microbiota oral y para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

La **cavidad oral** es un complejo hábitat formado por 500-1000 especies de microorganismos muchos de los cuales (50%) son incultivables (Marsh et al., 2004). Aunque en adultos sanos la mayoría de los microorganismos orales son bacterias incluidas dentro de Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Fusobacteria (Human Microbiome Project Consortium, 2012) también hay protozoos, virus y hongos. Aunque se han descrito más de 500 especies de origen oral, un individuo sano está colonizado por entre 100 y 200 especies bacterianas debido a que existen diferentes grupos de microorganismos que realizan las mismas funciones dentro de la microbiota, lo que se conoce como redundancia funcional (Lozupone et al., 2012). Estas especies características de cada individuo son el resultado de la combinación de varios factores que presentan un gran número de variables diferentes (Figura 1) entre los que destacan el ambiente, la genética, la edad, así como la forma de vida del hospedador (Costalonga y Herzberg, 2014; Rosier et al., 2017). Por ejemplo, la diversidad de la microbiota cambia con la edad del hospedador debido a eventos como la erupción de la dentición o aquellos relacionados con los cambios hormonales y/o del sistema inmune. También las diferencias genéticas y de la actividad del sistema inmune, así como la dieta y los hábitos del hospedador influyen en la

composición del microbioma oral. Además, debido a que existen múltiples micro-nichos dentro de la cavidad oral, la composición bacteriana también varía de una parte a otra de la boca siendo algunas bacterias características de ciertas localizaciones como el género *Streptococcus*, que es más común en la superficie vestibular de los dientes que en la superficie lingual, o *Veillonella* que está más presente en caninos que en incisivos, premolares y molares (Simón-Soro et al., 2013). Estas diferencias dentro de la cavidad oral se deben a las distintas condiciones ambientales relacionadas con el nivel de oxígeno, pH y nutrientes, así como la posible descamación de las superficies.

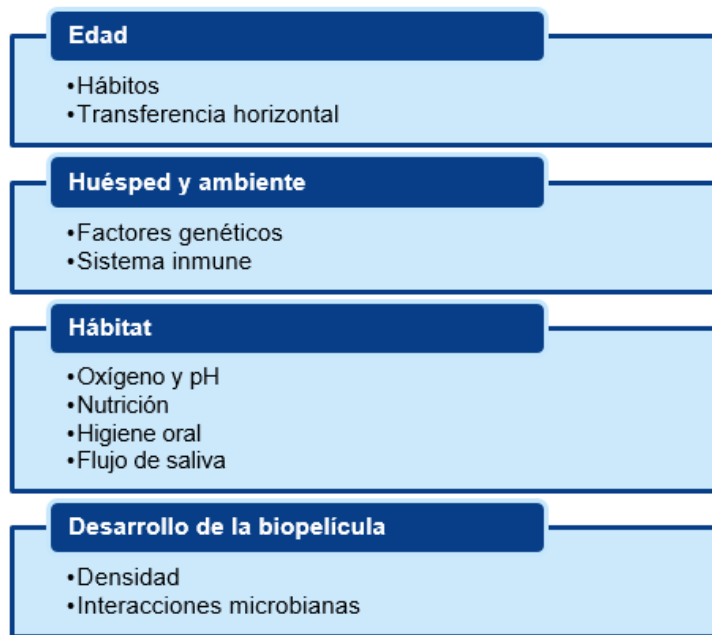


Figura 1. Factores principales que determinan la composición de la microbiota oral. Se muestran las principales variables que pueden diferir entre individuos o dentro de cada individuo en el tiempo. Modificado de Marsh et al., 2016.

En la mayoría de las enfermedades infecciosas el microorganismo responsable puede encontrarse en todos los casos de dicha enfermedad y su distribución se corresponde con las lesiones observadas según los postulados de Koch. Sin embargo, las dos principales enfermedades orales bacterianas en humanos, caries dental y enfermedad periodontal, no responden a estos postulados, sino que son enfermedades polimicrobianas que están causadas por alteraciones en la microbiota oral (disbiosis). A lo largo de la historia diferentes hipótesis han tratado de explicar el papel de las bacterias orales en el desarrollo de estas dos enfermedades (Rosier et al., 2014). La primera fue la **hipótesis específica de la placa** (Loesche, 1976) que propone que únicamente unas especies determinadas son las responsables de que se produzca la enfermedad. Sin embargo, se observó que estos patógenos putativos no se encuentran en todas las lesiones e incluso se han aislado de pacientes sanos. Por esta razón, se propuso la **hipótesis no específica de la placa** (Theilade, 1986) que defiende que la enfermedad se produce como consecuencia de cambios en la actividad de toda la microbiota oral. Con el objetivo de combinar ambas hipótesis surgió la **hipótesis ecológica de la placa**, que propone que el desarrollo de estas enfermedades se debe a un desequilibrio en la microbiota normal de la boca (Marsh et al., 1994), como respuesta a cambios locales en las condiciones ambientales como el pH, el potencial redox o la presencia de determinados nutrientes o factores esenciales (Marsh et al., 2003, 2006). Este proceso de desequilibrio conocido como **disbiosis** favorece el crecimiento de bacterias patobiontes, que al aumentar su proporción inician el desarrollo

de la enfermedad (Figura 2). Por ejemplo, la ingesta repetida de azúcares reduce el pH del medio debido a la producción de ácidos realizada por bacterias acidógenas y acidúricas, lo que aumenta el riesgo de la aparición de caries dental. En la enfermedad periodontal, un aumento en el flujo del líquido cervical debido a una respuesta inflamatoria excesiva del hospedador provoca el cambio en la microbiota normal, facilitando el crecimiento de las bacterias predominantes en la enfermedad. La última hipótesis propuesta es la **hipótesis del patógeno clave** (Hajishengallis et al., 2012), que sugiere que cierto patógenos, como *Porphyromonas gingivalis*, aunque estén en baja proporción pueden modificar la respuesta del sistema inmune y causar inflamación al aumentar la cantidad de la microbiota y modificar su composición.

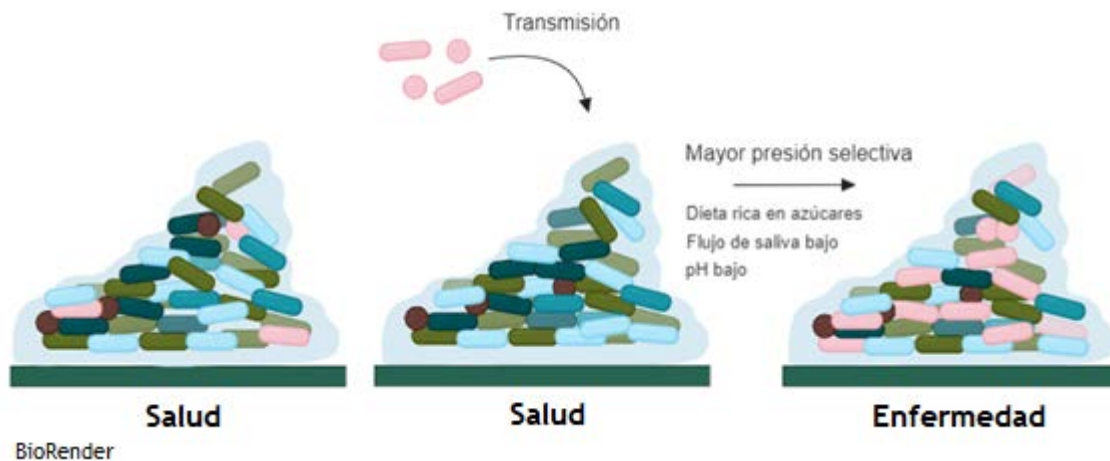


Figura 2. Relación entre la composición microbiana de la placa dental en la salud y en la enfermedad. Los patógenos potenciales (rosa) pueden representar una baja proporción dentro de la placa dental o ser transmitidos, ambos casos compatibles con un estado de saludable. Un cambio de las condiciones ambientales en las que aumente la representación de los patobiontes darán lugar a la enfermedad. Modificado de Marsh et al., 2006.

Aunque se han realizado grandes avances en cuanto a la comprensión de los mecanismos moleculares de las patologías orales, en la actualidad el área de salud bucodental está experimentando serias dificultades en su capacidad de trasladar a la práctica diaria los descubrimientos y las innovaciones tecnológicas obtenidos por la investigación en un tiempo razonable. A pesar de la alta incidencia y del elevado coste económico de las enfermedades bacterianas orales, la **prevención** de estas enfermedades bucodentales es compleja y problemática debido a varios factores: 1) principalmente su complicada etiología, en la que no existe una única bacteria responsable de cada enfermedad; 2) la complejidad del ecosistema que está compuesto por 500-1000 especies de microorganismos; 3) la dificultad de cultivo de las bacterias orales; 4) la falta de modelos *in vitro* establecidos que permitan la realización de estudios moleculares de biopelículas mixtas. Además, la cavidad oral es un sistema abierto y como se comentó anteriormente el microbioma oral está condicionado por diversos factores como son el propio individuo, el tipo de dieta, la forma de muestrear, así como la localización dentro de la cavidad oral (Costalonga y Herzberg, 2014). Así, existe una gran oportunidad en este campo para la introducción de **tratamientos alternativos** basados en la prevención de las enfermedades bucodentales bacterianas mediante productos menos agresivos que los antibióticos con el objetivo de que no ocasionen la aparición de las tan problemáticas resistencias.

2. Biopelícula oral o placa dental

Una de las primeras observaciones microscópicas de bacterias fue realizada por Antoine van Leeuwenhoek en el siglo XVII a partir de muestras de biopelícula oral, conocida más comúnmente como placa dental. Esta estructura presenta las mismas características que cualquier otro tipo de biopelícula, que es definida como un conjunto de microorganismos embebidos dentro de una matriz de sustancias poliméricas que se encuentran adheridos a cualquier tipo de superficie (Figura 3). En concreto, la biopelícula oral está formada por una comunidad de microorganismos extremadamente diversa y variable, siendo un alto porcentaje de estos incultivables (<http://www.oralgen.org/> ; <http://www.homd.org/>).

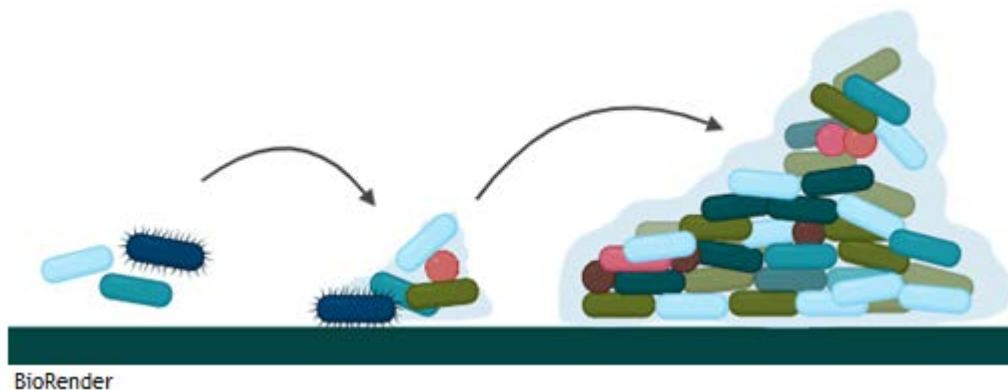


Figura 3. Formación de una biopelícula. Los microorganismos se fijan a una superficie y producen gran cantidad de polisacáridos y otras macromoléculas que los envuelven y le dan aspecto gelatinoso.

En general, las biopelículas son comunidades microbianas muy complejas que juegan un papel muy importante en la salud humana, estimándose que son responsables de hasta el 80% de las infecciones bacterianas (Davies, 2003; Moreau-Marquis et al., 2008). Entre estas infecciones se incluyen las enfermedades bucodentales, caries dental y enfermedad periodontal, pero también complicaciones durante el embarazo, diabetes, y enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Scannapieco, 1999; Scannapieco et al., 2003; Paju y Scannapieco, 2007). Además, cabe destacar que la expresión fenotípica dentro de la biopelícula es diferente a la de la misma bacteria en estado planctónico (Tabla 1), siendo la mayor protección de los microorganismos frente a las defensas del hospedador durante la infección y el aumento de la tolerancia a los antibióticos (Walker y Sedlacek, 2007) las características más importantes debido a su gran impacto en la práctica clínica. El hecho de que la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos vuelva a su estado original después de la dispersión de la biopelícula parece indicar que esta tolerancia es más fenotípica que genotípica.

Existen varias teorías que intentan explicar esta mayor resistencia a los antibióticos de las bacterias incluidas dentro de una biopelícula. La gran cantidad de polisacáridos extracelulares que conforman la matriz extracelular en la que se encuentran embebidas las bacterias podría ser la responsable de esta mayor resistencia, al constituir una barrera física frente a la entrada de sustancias inhibitorias. Otra posibilidad es que debido a que la mayoría de las células de la biopelícula crecen muy lentamente, en un estado de privación de nutrientes, no serían susceptibles al efecto de los agentes antimicrobianos. Un tercer aspecto podría estar relacionado con un aumento de las bombas de expulsión de fármacos en las células que forman la biopelícula (Donlan y Costerton, 2002). Sin embargo, también debe tenerse en cuenta que muchos de los microorganismos incluidos en las biopelículas

adquieren resistencia a los antibióticos debido a las que las condiciones que se dan dentro de estas estructuras son ideales para la transferencia horizontal de genes de resistencia (Tabla 1) (Marsh et al., 2016).

Tabla 1. Propiedades características de las comunidades bacterianas que forman una biopelícula y su presencia específica en la placa dental (Modificado de Marsh et al., 2016).

Propiedades generales de las biopelículas	Ejemplos de placa dental
Arquitectura abierta	Presencia de canales
Protección frente a las defensas del hospedador, desecación, etc.	Producción de polímeros extracelulares que forman una matriz funcional; protección física contra la fagocitosis
Aumenta la tolerancia a los antimicrobianos	Reduce la sensibilidad a los antibióticos; facilita la transmisión de los genes de resistencia
Neutralización de inhibidores	La producción de β -lactamasas protege a las células sensibles
Expresión de genes nuevos	Producción de nuevas proteínas durante la adhesión, aumento de la expresión de glucosiltransferasas en biopelículas maduras
Respuestas génicas coordinadas	Producción de moléculas de <i>quorum sensing</i>
Heterogeneidad espacial y ambiental	Gradientes de pH y O ₂ ; cohesión
Mayor amplitud de hábitat	Anaerobios obligados en un ambiente abiertamente aeróbico
Metabolismo más eficiente	Catabolismo de macromoléculas complejas procedentes del hospedador por el consorcio microbiano.
Aumento de la virulencia	Sinergia de la patogenicidad en abscesos y enfermedad periodontal

La **formación de la placa dental** puede dividirse en varias etapas (adhesión, crecimiento/maduración, difusión y readhesión). Estas ocurren constantemente ya que la biopelícula oral se encuentra en una continua reorganización (Kolenbrander et al., 2006; Marsh et al., 2016). Segundos después del cepillado de los dientes, en el que se realiza una limpieza mecánica de los mismos, las proteínas y glicoproteínas presentes en la saliva empiezan a ser adsorbidas por las piezas dentales formando la denominada película salival adquirida. Dentro de esta película se inmovilizan algunos enzimas procedentes tanto de las bacterias orales como del hospedador (amilasas, lisozimas, fructosiltransferasas, glucosiltransferasas). Destaca la presencia de glucano, que tiene una gran importancia en la posterior adhesión bacteriana. Después de dos horas ya pueden observarse diferencias entre las biopelículas formadas en posición lingual (20-80 nm espesor) y bucal (200-700 nm espesor). Debido al transporte pasivo de los microorganismos hacia la superficie de los dientes por la saliva se produce una adhesión reversible de los mismos. Esta interacción es muy débil ya que tanto la superficie celular de los microorganismos como muchas de las proteínas presentes en la película adquirida presentan carga negativa. Sin embargo, esta unión se hace rápidamente más fuerte y más permanente por la presencia de las adhesinas, moléculas de la superficie celular que conectan de forma muy específica con receptores de la película adquirida (Jenkinson y Lamont, 1997; Lamont y Jenkinson, 2000). Los primeros colonizadores que se establecen sobre la superficie limpia de los dientes son los miembros del género *Streptococcus*, especialmente los del grupo mitis (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*) pero también están presentes especies de *Eikenella* spp., *Prevotella* spp., *Capnocytophaga* spp., *Veillonella* spp., *Haemophilus* spp., y *Prionibacterium* spp. (ten Cate, 2006).

A medida que se desarrolla la placa dental esta se vuelve más diversa mediante un proceso conocido como **sucesión microbiana**. Esto tiene lugar debido a que los colonizadores primarios cambian mediante su metabolismo las condiciones ambientales de la boca haciéndolas más adecuadas para el crecimiento de bacterias con mayores requerimientos: consumen oxígeno y producen dióxido de carbono volviendo el ambiente más anaeróbico y producen compuestos que pueden ser utilizados por otras bacterias como fuentes primarias de nutrientes. Además, algunas bacterias son incapaces de unirse directamente a la película salival adquirida por lo que necesitan adherirse a los colonizadores primarios mediante interacciones lectina-receptor. Esto recibe el nombre de coadhesión o coagregación y es esencial en la formación de la biopelícula oral. La bacteria *Fusobacterium nucleatum* es capaz de coagregar con una amplia variedad de bacterias, incluyendo colonizadores primarios y secundarios, pero es incapaz de unirse consigo misma. Por eso, se cree que *F. nucleatum* sirve de puente entre los colonizadores primarios y los tardíos que son incapaces de coagregar entre sí (Kolenbrander et al., 2006; Marsh et al., 2016). Se ha visto que algunas bacterias orales se encuentran asociadas en grupos (Socransky et al., 1998), de forma que si en una muestra encontramos una bacteria específica lo más común es que también encontremos a más miembros del cluster al que pertenece.

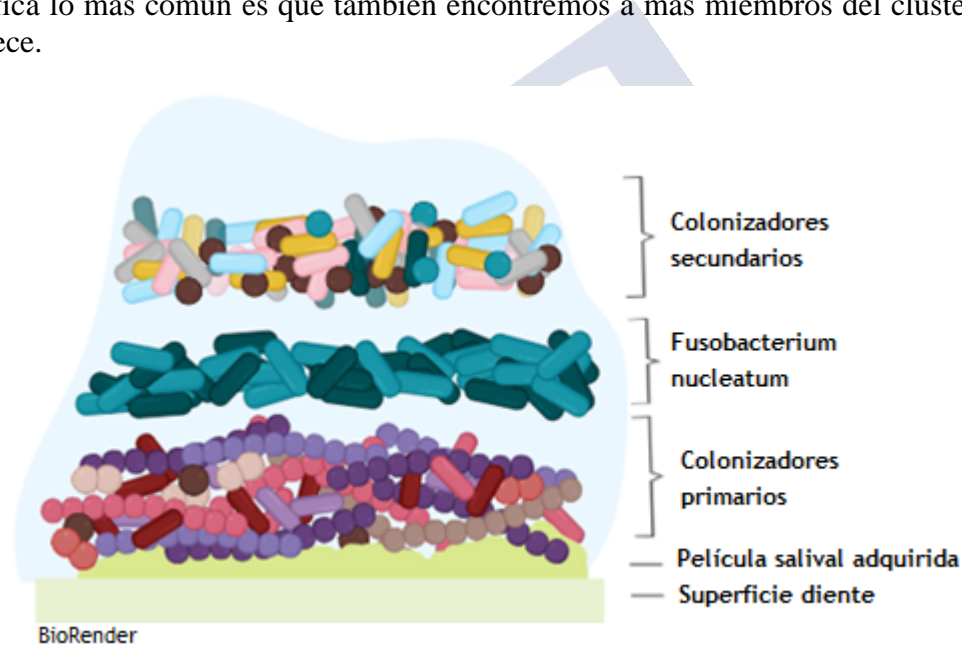


Figura 4. Representación de la secuencia de la colonización oral bacteriana sobre la superficie de los dientes que da lugar a la placa dental. Modificado de Kolenbrander et al., 2006.

A medida que se forma la placa dental (Figura 4), se van acumulando los compuestos que forman la matriz extracelular, que además de cumplir una función estructural también es biológicamente activa puesto que retiene agua, nutrientes y enzimas en el interior de la biopelícula (Allison, 2003). La matriz está formada principalmente por polímeros (como fructanos, y glucanos solubles e insolubles), proteínas y ácido desoxirribonucleico extracelular (ADNe). La importancia de este último se ha puesto de manifiesto recientemente pues contribuye a la integridad de la biopelícula, está relacionado con la transferencia horizontal de genes y su liberación en grandes cantidades está controlada por mecanismos de comunicación bacteriana (Das et al., 2013). Algunos microorganismos pueden diseminarse a partir de la biopelícula y propagar la infección por el resto del organismo debido a la acción de los surfactantes producidos por algunas bacterias.

Como se comentó anteriormente, la utilización de antibióticos para el tratamiento de enfermedades asociadas a biopelículas es particularmente problemática debido a las diferencias fenotípicas de sus bacterias y a la aparición de resistencias. Por ello, es necesaria la búsqueda y el desarrollo de nuevas sustancias antipatogénicas, que inhiban la virulencia bacteriana pero que no afecten el crecimiento de los microorganismos reduciendo la aparición de resistencias. Durante las últimas décadas, los investigadores han desarrollado diferentes métodos para el estudio de las biopelículas utilizando distintos **modelos *in vitro*** (McBain, 2009; Maske et al., 2017) lo que ha permitido grandes avances en cuanto a la comprensión de los mecanismos moleculares de su formación y su relación con las patologías orales. A grandes rasgos hay dos grandes clases de modelos de biopelículas según presenten o no algún tipo de flujo durante su formación. Son los llamados modelos dinámicos o estáticos, respectivamente. Dentro de los modelos dinámicos existe una gran diversidad encontrándonos con cámaras/celdas de flujo (Seemann et al., 2005), *multiplaque artificial mouth* (MAM) (Sissons et al., 1991), *constant depth film fermenter* (CDFF) (Peters y Wimpenny, 1988), quimiostatos (Bradshaw y Marsh, 1994), *multi-station continous-culture biofilm model* (MSCBM) (Schwendick et al. 2014), *artificial mouth computer controlled* (AMCC) (Mei et al., 2013a; 2013b) y el reactor de biopelícula del *center for disease control* (CDC) (Rudney et al., 2012). En cambio, los modelos estáticos se realizan en placas microtiter (Stepanovic et al., 2000; Muras et al., 2018b) o en placas Petri (Totiam et al., 2007). Dentro de los modelos dinámicos los tres que más se utilizan son: las cámaras/celdas de flujo (37,10%), los MAM (25,81%) y los CDFF (16,13%). En cuanto a los sistemas estáticos hay una clara preferencia por las placas de microtiter (91,3%) frente a las placas Petri (8,7%) (Maske et al., 2017). En ambos casos, la principal limitación es el desprendimiento de la biopelícula durante la manipulación de la misma, ya sea por el pipeteado para realizar un cambio de medio de cultivo o para llevar a cabo alguno de las fases de lavado de las técnicas de cuantificación mediante tinción. Recientemente, dentro de los sistemas estáticos se ha propuesto el uso del equipo xCELLigence® System RTCA (ACEA, Biosciences Inc.) (Junka et al., 2010; Cihalova et al., 2015) el cual ha sido validado para la medición de formación de biopelículas de Gram-positivos en tiempo real (Ferrer et al., 2016, Gutiérrez et al., 2016; Muras et al., 2018b) y muy recientemente para biopelículas orales (Mira et al., 2019). Por su parte el xCELLigence® System RTCA realiza la medición mediante unos sensores microelectrónicos integrados en el fondo de unas placas especiales denominadas E-plates, por lo que este equipo solamente cuantifica la biopelícula que se forma en el fondo del pocillo no siendo capaz de detectar la que tiene lugar en la interfase aire-líquido. Además, este sistema no permite el cambio de medio de cultivo. Todos los sistemas utilizados para el estudio de las biopelículas, ya sean dinámicos o estáticos, presentan limitaciones que deben de tenerse en cuenta. Una gran limitación de los sistemas dinámicos es que no presentan una forma de crecimiento de biopelícula independiente de forma que solo se puede ensayar una condición por experimento necesiándose realizar varios lotes experimentales lo que es altamente costoso, no solo económicamente sino también en referente al tiempo. En cambio, una de las grandes limitaciones de los modelos estáticos es su limitada capacidad de reproducir las condiciones ambientales de la cavidad oral (Maske et al., 2017) y que cuantifican tanto las células adheridas como las sedimentadas, razón por la cual Exterkate et al., (2010) proponen el uso de un modelo de adhesión activa, *Active Attachment Amsterdam model* (AAA model). Este modelo estático permite el cambio de medio por lo que la biopelícula se forma mediante adhesión y no por sedimentación como la mayoría de metodologías, así como el uso de diferentes sustratos como el cristal, la hidroxiapatita o la dentina (Exterkate et al., 2010).

2.1 Caries dental

La caries es una enfermedad crónica transmisible que causa la destrucción localizada de los tejidos dentales duros por los **ácidos**, especialmente el ácido láctico, producidos por los depósitos microbianos adheridos a los dientes. La producción de estos ácidos por las bacterias provoca un cambio en el pH que conduce a la desmineralización de los dientes por la pérdida tanto de calcio como de fosfato. De esta forma, estas lesiones comienzan como pequeñas áreas de desmineralización bajo la superficie del esmalte y una vez este se encuentra afectado, la caries progresa a través de la dentina hasta la pulpa. Se cree que la acidificación del ambiente mediada por microorganismos productores y resistentes al ácido es la principal causa que provoca los cambios fenotípicos que se producen dentro de la compleja comunidad microbiana durante el proceso cariogénico. Desde los años 50 se ha considerado a *Streptococcus mutans* como la bacteria responsable de la caries dental humana, siendo su habilidad para adherirse sobre la superficie de los dientes, iniciando la formación de la placa dental, uno de los factores de virulencia más importantes. Esta bacteria produce grandes cantidades de exopolisacáridos, especialmente en presencia de sacarosa, que favorecen dicha adhesión al diente. Sin embargo, estudios basados en el análisis de ADN y ARN procedentes de caries han visto que esta bacteria solo es una pequeña fracción de la comunidad bacteriana oral (Simón-Soro et al., 2014). Aunque la compleja composición microbiana de la cavidad oral cambia durante el desarrollo de la caries aumentando la proporción relativa de *S. mutans* desde un 0,12% en la placa dental hasta un 0,72% en caries de esmalte, son *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguinis* los estreptococos dominantes en estas lesiones (Simón-Soro et al., 2013). Otras especies que también se han relacionado con el inicio de las caries son *Streptococcus parasanguinis* y *Actinomyces* spp. mientras que los géneros *Atopobium*, *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* parecen estar más asociados con la progresión de las mismas (Anderson et al., 2018). Además, se ha visto que diferentes microorganismos como *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus* pueden ser cariogénicos bajo determinadas condiciones. A pesar de esto, en estudios de vacunación realizados con animales se ha visto que la inmunización contra las células o antígenos específicos de *S. mutans* reduce el número de lesiones cariogénicas (Huang et al., 2013; Batista et al., 2014). Esto podría deberse a que, curiosamente, *S. mutans* parece estar asociado al inicio del proceso cariogénico, pero no a la progresión del mismo (Gross et al., 2010).

Como se comentó anteriormente, según la **hipótesis ecológica de la placa** (Marsh et al., 1994, 2003) el desarrollo de la caries dental se produce por cambios en las condiciones ambientales que cambian la microbiota oral normal y facilitan la proliferación de patobiontes que hasta ese momento se encontraban en una baja proporción. Esta hipótesis ha sido extendida para el caso concreto de la caries para incluir la habilidad de algunas bacterias para adaptarse a un ambiente ácido (**hipótesis ecológica de la caries extendida**) (Marsh et al., 2006; Marsh et al., 2016). El proceso cariogénico se puede dividir en tres estadios reversibles (Figura 5):

- 1) Estadío dinámico: el ácido solo se produce después de las comidas y este puede ser neutralizado por la saliva. La des- y la remineralización se encuentran en equilibrio.
- 2) Estadío acidogénico: algunas bacterias se adaptan a las condiciones de bajo pH debidas a una mayor ingesta de azúcares y aumentan su producción de ácidos. Estas condiciones favorecen el crecimiento de especies acidogénicas y ácido-tolerantes. El equilibrio entre la des- y la remineralización se rompe en favor de la desmineralización.

- 3) Estadío acidúrico: si estas condiciones a bajo pH se mantienen, las bacterias acidogénicas y acidúricas serán más eficientes y aumentará su proporción. Este paso acelera la progresión de la caries porque se produce una profunda perturbación en el equilibrio mineral.



Figura 5. Fases del proceso cariogénico en las que la acidez del medio tiene un papel clave en los procesos de des- y remineralización.

La posibilidad de sufrir caries no solo es diferente de un individuo a otro, sino que también puede cambiar dentro de un mismo individuo a lo largo de su vida, ya que se ha demostrado gracias al uso de modelos animales la importancia tanto de la transmisibilidad como de la dieta en la aparición de las caries. Con una dieta convencional, los niveles de bacterias potencialmente cariogénicas son clínicamente insignificantes y los procesos de des- y remineralización se encuentran en equilibrio. Sin embargo, si se aumenta la frecuencia y la cantidad ingerida de carbohidratos, el ambiente estará mayoritariamente por debajo del pH crítico (pH 5,5) para la desmineralización del esmalte. Esto producirá una alteración en la microbiota oral normal (disbiosis) ya que estas condiciones ácidas favorecen la proliferación de estreptococos y lactobacilos que a su vez promueven la desmineralización al aumentar el carácter ácido del medio, y así sucesivamente. Por lo tanto, como se ha visto, aunque existen numerosos microorganismos potencialmente cariogénicos, lo que da lugar a la aparición y al desarrollo de la caries son los cambios provocados por la acidificación del medio. Por ello, la prevención de las caries podría hacerse mediante la inhibición de los patógenos potenciales, así como tratando de controlar los factores ambientales que propician su aparición. Para ello, algunos autores han sugerido la posibilidad de usar probióticos que actúen como colonizadores activos. Un ejemplo de esta estrategia es el uso como probiótico propuesto para una nueva bacteria oral descrita recientemente, *Streptococcus dentisani* (Camelo-Castillo et al., 2014), que se encuentra presente en un alto porcentaje de pacientes sanos (98%). Esta bacteria es capaz de inhibir el crecimiento de los principales patógenos orales debido a la producción de bacteriocinas y además presenta un efecto tamponador sobre el pH para prevenir que la cavidad oral se vuelva ácida (López-López et al., 2017). Sin embargo, a partir de la reclasificación de esta cepa a *S. oralis* ssp. *dentisani* varios autores han manifestado la capacidad de algunas cepas con esta clasificación taxonómica de causar endocarditis en pacientes inmunocomprometidos (Rasmussen et al., 2017; Conrads et al., 2018).

2.1 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal consiste en una serie de alteraciones patológicas de los tejidos que soportan los dientes que pueden ser reversibles (gingivitis) o irreversibles (periodontitis). La **gingivitis** es una inflamación reversible de los tejidos marginales asociados a placa dental, mientras que la **periodontitis** es la inflamación de los tejidos

periodontales (de soporte, calcificados y no calcificados) que produce la destrucción del hueso alveolar (Figura 6).



Figura 6. Estado del diente y de los tejidos que lo rodean desde un estado saludable a un estado con una patología periodontal.

Se considera que la enfermedad periodontal tiene un origen polimicrobiano, ya que tiene lugar por un aumento en la abundancia de especies patobiontes que generalmente se encuentran en menor frecuencia dentro de la comunidad bacteriana del bolsillo periodontal (Hajishengallis et al., 2011) y en la que también interviene una respuesta inflamatoria exagerada del hospedador debido a la acumulación de la placa dental (Marsh et al., 2016). Se ha observado que durante el proceso periodontal se produce una modificación en la composición de la microbiota oral que se hace más diversa, y se da un cambio progresivo desde una comunidad dominada por bacterias Gram-positivas hacia una población con una mayor proporción de bacterias Gram-negativas anaerobias estrictas. Estos cambios dentro de la microbiota oral se corresponderían con la progresión de un estado saludable hacia el desarrollo de gingivitis y posteriormente periodontitis. Por esta razón suele asociarse una mayor diversidad del microbioma de la placa dental con la enfermedad periodontal, más que con un estado saludable.

A diferencia de lo que ocurre durante el proceso cariogénico, en la enfermedad periodontal los patobiontes no pueden utilizar los carbohidratos (son asacarolíticas) sino que utilizan como fuente de energía las proteínas. A pesar de esto, algunos autores también aplican la hipótesis ecológica de la placa (Marsh et al., 1994, 2003) para explicar la etiología de esta enfermedad (Marsh et al., 2016). Sin embargo, otros autores creen que la enfermedad periodontal no puede explicarse basándose solamente en una de las hipótesis mencionadas anteriormente, sino que se necesita una combinación de las mismas (Rosier et al., 2014). Cambios en las condiciones de la región subgingival, como un aumento en el flujo del líquido gingival cervicular con su consiguiente aumento del pH (7,4-7,8) y de la temperatura, favorecen el crecimiento de las bacterias patobiontes proteolíticas en comparación con la microbiota oral normal (Hajishengallis et al., 2011). Todos estos cambios en el ambiente modifican la expresión génica y aumentan la competitividad de los patógenos periodontales.

A pesar de que *P. gingivalis* también se ha encontrado en condiciones saludables se cree que esta bacteria juega un papel clave como patógeno en el inicio de la enfermedad periodontal (Hajishengallis et al., 2011). Sin embargo, otras bacterias también son necesarias para su desarrollo. Desde los años 50, dos grupos de bacterias: el complejo rojo (*P. gingivalis*, *Bacteroidetes forsythus*, *Treponoma denticola*) y el complejo naranja (*Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus micros*) han sido considerados los principales responsables del inicio y progresión de la enfermedad periodontal (Socransky et al., 1998), siendo el complejo rojo el más identificado en los bolsillos

periodontales profundos, aunque suele estar precedido por el complejo naranja. Aunque estos microorganismos se han encontrado también en individuos sanos, estudios de hibridación ADN-ADN han confirmado la asociación de estas bacterias con la periodontitis. Sin embargo, parece evidente de que microorganismos desconocidos podrían estar implicados en el inicio o progresión de la enfermedad periodontal (Hiranmayi et al., 2017). El uso de nuevas técnicas de secuenciación ha permitido la identificación de otros microorganismos que también juegan un papel clave en el desarrollo de esta enfermedad: *Cryptobacterium*, *Desulfobulbus*, *Megasphaera*, *Selomonas*, *Treponema* y *Synergistes* (Kumar et al., 2005; Hiranmayi et al., 2017). Por su parte, la presencia de la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está fuertemente asociada a la periodontitis de tipo agresivo (Henderson et al., 2003).

Durante el desarrollo de la enfermedad periodontal se produce una sinergia patogénica ya que, aunque estos patobiontes individualmente no son capaces de provocar una enfermedad, la combinación de estos sí que la produce. Algunas de estas bacterias (patógenos primarios) pueden producir enzimas que dañan los tejidos directamente como *P. gingivalis* o *Treponema* spp. pero su persistencia dependerá de la presencia de otros microorganismos (patógenos accesorios) ya sea porque estos aportan nutrientes esenciales para el crecimiento (vitamina K, succinato) o porque contribuyen con puntos de adhesión. Además, estos patógenos accesorios también pueden colaborar con los patógenos primarios al bloquear las defensas del hospedador o inhibir el crecimiento de otras bacterias competidoras. Cada vez se piensa más en la enfermedad periodontal como la combinación de una **reacción exagerada de la respuesta inflamatoria** del hospedador ante la presencia de una creciente placa dental y la modificación tanto de la composición como de la actividad de la microbiota debido a una serie de cambios en las condiciones ambientales (lo que a su vez aumenta la respuesta del hospedador). Debido a esto un posible tratamiento preventivo de la enfermedad periodontal debería de actuar contra los patógenos potenciales y/o también contra aquellos factores ambientales que intervienen en el desequilibrio de la microbiota.

3. Quorum sensing

A lo largo de la historia se ha considerado a las bacterias como seres simples y primitivos, carentes de dimensión social. Sin embargo, durante los últimos 40 años se ha ido descubriendo la existencia de diversos y sofisticados sistemas de señales que les proporcionan a las bacterias herramientas moleculares para el desarrollo de verdaderos lenguajes bacterianos que han cambiado por completo la visión que se tenía del mundo microbiano. Estos comportamientos colaborativos que se producen dentro de las poblaciones bacterianas gracias a los sistemas de comunicación son muy parecidos a los que realizan los organismos pluricelulares, pero solo tienen lugar cuando las bacterias están en densidades altas. Este hecho ha propiciado que haya surgido recientemente una nueva disciplina dentro de la microbiología que intenta comprender como las bacterias funcionan en comunidad, la **sociomicrobiología**.

A pesar de que esta capacidad de los microorganismos para comunicarse pueda parecer algo relativamente novedoso, fue en los años 30 del siglo XX cuando se observó por primera vez la dependencia de un proceso microbiano, la regulación de la transformación genética, con la densidad de cultivo en la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, sugiriéndose la posible existencia de una señal extracelular (Dawson y Sia, 1931; Tomasz y Hotchkiss, 1964). Sin embargo, fue el estudio de la bioluminiscencia en la bacteria marina simbiote *Vibrio fischeri* en los años 70 (Nealson, 1977; Nealson y Hastings, 1979) el que permitió

detallar tanto las moléculas como los genes responsables, considerándose a día de hoy el primer caso de QS descrito.

El proceso de comunicación bacteriana dependiente de la densidad celular, también llamado *quorum sensing* (QS), se lleva a cabo para la monitorización del tamaño de la población mediante la producción y liberación al medio de cultivo de pequeñas moléculas de señalización química, denominadas **autoinductores** (AIs). Estas moléculas se detectan por receptores específicos lo que permite a la bacteria distinguir entre una baja o alta densidad poblacional. A medida que la población bacteriana aumenta se produce un incremento del nivel extracelular del AI y cuando se alcanza el nivel umbral (*quorum*), las bacterias detectan que están en comunidad y toda la población cambia de manera simultánea la expresión de sus genes, realizando una acción coordinada (Figura 7). Esta es la razón por la cual este proceso se denomina *quorum sensing* (QS) (Fuqua et al., 1994).

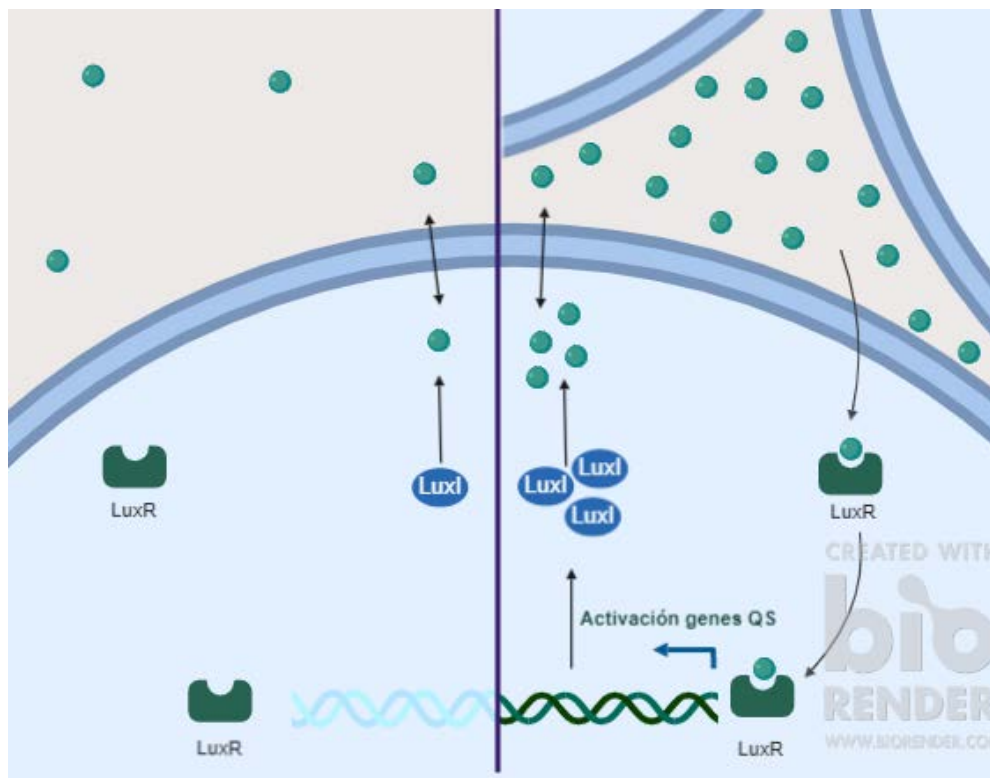


Figura 7. Detección de QS mediante la producción de moléculas autoinductoras. A una baja densidad celular, se produce una baja cantidad de señal (círculos). A altas densidades, la concentración de la señal en el medio es mayor, alcanza una concentración mínima y se une al receptor (LuxR) que aumenta la transcripción de la sintasa (LuxI) por autoinducción y activa los genes controlados por QS.

El QS controla la expresión de los factores de virulencia de numerosos patógenos, tanto humanos como de animales y plantas (Fuqua y Greenberg, 2002; Bassler y Losick, 2006; Williams et al., 2007; Grandclément et al., 2016), de forma que estas bacterias patógenas lanzan su ataque sólo cuando son lo suficientemente numerosas como para superar las defensas del hospedador. Existe una gran cantidad de funciones que son controladas por los genes de QS pero generalmente estas pueden clasificarse en cuatro categorías funcionales (Grandclément et al., 2016): 1) mantenimiento celular y proliferación (producción de exoenzimas, síntesis de sideróforos, esporulación, resistencia al ácido, etc.); 2) comportamiento celular (formación y dispersión de biopelícula, motilidad, adhesión, etc.); 3) transferencia genética horizontal (conjugación plasmídica, competencia) y 4)

interacciones con el huésped y otros microorganismos (factores de virulencia, producción de exopolisacáridos, bioluminiscencia, antibióticos, factores de colonización del huésped).

Los diferentes sistemas de QS descritos se basan en el reconocimiento específico entre el receptor y la señal autoinductora. Los microorganismos han desarrollado **diferentes lenguajes** intraespecíficos e interespecíficos, lo que les permite tener “conversaciones públicas” y “conversaciones privadas” para reconocer el tamaño de la propia población y de las poblaciones vecinas, modulando la expresión génica en función de sus necesidades (Schauder y Bassler, 2001). Aunque inicialmente el QS hacía referencia a fenómenos de respuesta a densidad celular mediados por moléculas de tipo acil-homoserin lactonas (AHLs) en bacterias Gram-negativas, se ha extendido también para sistemas que utilizan otras moléculas señal diferentes. Las moléculas señal identificadas hasta el momento se han detectado en concentraciones que van generalmente desde a pM a nM, llegando incluso a μM (Leadbetter y Greenberg, 2000; Romero et al., 2014; Zapata et al., 2017). Se ha observado que los cambios en las condiciones ambientales pueden modificar la producción de estas moléculas de QS al afectar a su estabilidad (Kalia et al., 2014; Mayer et al., 2018). Por ejemplo, debido a la variación de pH (6-11) a lo largo del ciclo diurno, durante el día se produce una rotura espontánea de algunas AHLs (menores que C12-HSL) debido a la alcalinidad del medio (Yates et al., 2002). De esta forma, las AHLs de cadena corta deben de ser producidas por la noche y la mayoría de las largas estarían activas durante la mayor parte del tiempo (Kalia et al., 2014).

Se han descrito numerosas moléculas señal implicadas en los sistemas de QS (LaSarre y Federle, 2013; Grandclément et al., 2016), pero hay tres tipos de autoinductores que son los considerados más importantes y por tanto los más estudiados: acil-homoserin lactonas (AHLs), péptidos señal (AIPs) y autoinductor-2 (AI-2) (Figura 8).

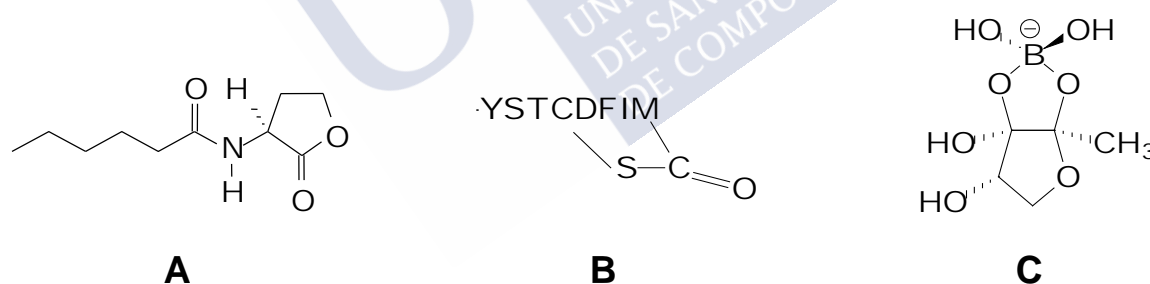


Figura 8. Principales tipos de señales de *quorum sensing* en bacterias. A) Se muestra *N*-hexanoil-L-homoserin lactona (C6-HSL), molécula de la familia de las *N*-acilhomoserin lactonas (AHLs). B) Se muestra uno de los autoinductores de *Staphylococcus aureus*. C) Se muestra el diéster furanosil borato o AI-2.

1. Acil-homoserin lactonas (AHLs), consideradas típicas de Gram-negativas, aunque se ha descrito su producción en la cepa Gram-positiva *Exiguobacterium* MPO (Biswa y Doble, 2013). Estas moléculas son las señales de QS más estudiadas. Están formadas por un anillo lactona (HSL) al que se une un ácido graso que constituye la cadena lateral mediante un enlace amida (Figura 8A). Los distintos tipos de AHLs se pueden diferenciar en la longitud de cadena lateral (entre 4 y 20 carbonos), en su estado de saturación y en si presentan sustituciones Oxo- ó Hidroxi- en el tercer carbono. El sistema típico de QS mediado por AHLs está formado por una sintasa tipo LuxI y por un receptor intracelular LuxR (Ng y Bassler, 2009) pero hay también otras sintasas que pertenecen a las familias LuxM/AinS o HdtS que no presentan similitud con LuxI (Gilson et al., 1995;

Laue et al., 2000). Recientemente se ha descrito la existencia de otras moléculas acil-HSLs capaces de activar los receptores tipo LuxR. Las sintasas responsables de la producción de estas moléculas son RpaO, PpyS y DarABC y han sido denominadas “sintasas de dialectos” (Brameyer et al., 2015). Además, se ha descrito la producción de AHLs en vibrios en los cuales no se ha podido identificar la sintasa responsable (Girard et al., 2019). Existen bacterias que no producen AHLs o no tienen una sintasa LuxI reconocible, pero poseen homólogos de LuxR que pueden interactuar con las AHLs producidas por otras bacterias y que reciben el nombre de LuxR huérfanos (Patankar y Gonzalez, 2009; Muras et al., 2018b). La presencia de LuxI huérfanos también se ha descrito en la naturaleza, pero es mucho más rara (Cude y Buchan, 2013). La mayoría de AHLs difunden libremente a través de la membrana bacteriana, pero las de cadena más larga utilizan un sistema de transporte (Whitehead et al., 2001; Fuqua y Greenberg, 2002). Además de funcionar como moléculas señal en los sistemas de QS, las AHLs presentan otras propiedades biológicas, ya que algunas AHLs de cadena larga también pueden actuar como biosurfactantes y antibióticos (Kauffman et al., 2005; Daniels et al., 2006).

2. Péptidos autoinductores (AIPs) de Gram-positivas. Las moléculas señal en estas bacterias son pequeñas proteínas de entre 5 y 34 residuos aminoacídicos, generalmente de arquitectura compleja (Figura 8B). A diferencia de las AHLs, los AIPs son altamente específicos y necesitan ser exportados activamente al medio, proceso durante el cual algunos de ellos se modifican, para poder interactuar con los dominios externos de receptores de membrana. La activación de los genes de QS que participan en la secreción de factores de virulencia, esporulación y competencia, se realiza a través de la transducción de la señal mediante una cascada de fosforilación que culmina en la activación de una proteína que modula la transcripción de los genes diana (Kleerebezem et al., 1997; Lazazzera et al., 1997).

3. AI-2, que se encuentra tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, por lo que se considera que actúa como señal interespecífica (Miller y Bassler, 2001; Federle y Bassler, 2003). Se trata de un conjunto de moléculas de estructura similar a un diéster furanosil borato. La sintasa de AI-2, llamada LuxS, presenta una amplia distribución filogenética, estando presente en una gran cantidad de especies bacterianas (Schauder y Bassler, 2001). Sin embargo, como LuxS juega un papel muy importante en el metabolismo de la metionina, en el reciclaje de la homocisteína y en la acumulación de intermediarios de la s-adenosil metionina (SAM) (Pereira et al., 2013) y participa también en la síntesis de proteínas, de ARN y de ADN (Sztajer et al., 2008), existe cierta controversia respecto al papel de esta molécula como señal de QS.

Se han encontrado **otras moléculas autoinductoras** que actúan como moléculas señal pero solo han sido identificadas en ciertas bacterias. Algunos ejemplos son las γ -butilactonas en *Streptomyces* y *Xanthomonas* (Ohnishi et al., 1999; Winans y Bassler, 2002), los dipéptidos cíclicos (CDPs) y la señal quinolona (PQS) en *Pseudomonas* y *Burkholderia* spp. (Dubern y Diggle, 2008), el factor señal difusible (DSF) de *Xanthomonas campestris*, *Burkholderia cenopacia* y *Xyllela fastidiosa* (Barber et al., 1997; LaSarre y Federle, 2013) o la señal AI-3, muy similar a la adrenalina, producida por bacterias intestinales (LaSarre y Federle, 2013). Aunque en la actualidad se encuentra desactualizado, existe un repositorio llamado SigMol (Rajput et al., 2016) donde se pueden consultar diferentes moléculas de QS producidas por distintos organismos procariontes. Esta base de datos contiene 1382 entradas con 182 moléculas de señalización diferentes obtenidas de 215 organismos. En cambio, la base de datos Quorumpeps® solo contiene información química

y funcional sobre péptidos que actúan como señales de QS, así como sus derivados (Wynendaele et al., 2013).

En muchos casos, varios sistemas de comunicación funcionan simultáneamente controlando genes distintos o funcionando de forma sincronizada o en cascada. Aunque estos sistemas de comunicación intercelular han sido descritos inicialmente para procariotas, se ha descubierto que los organismos eucariotas también han desarrollado sistemas similares. Algunos procesos que tienen lugar en organismos eucariotas como el desarrollo de micelio aéreo en *Candida albicans* (Atkinson y Williams, 2009), el crecimiento del ciliado *Tetrahymena thermophila* (Christensen et al., 1998) y la inducción de la reproducción sexual en rotífero (*Brachionus plicatilis*) (Kubanek y Snell, 2008) están controlados por sistemas de QS. Algunos eucariotas también responden a los sistemas de QS de procariotas. Se ha visto que las zoosporas de macroalgas del género *Enteromorpha*, así como las larvas del crustáceo *Balanus improvisus* muestran preferencia para adherirse a biopelículas que contienen señales de QS tipo AHLs (Joint et al., 2002; Tait et al., 2005; Tait y Havenhand, 2013). Incluso organismos superiores como las plantas y los animales son capaces de responder ante las señales de QS, las cuales en muchos casos modulan sus sistemas inmunes (Rice et al., 1999; Shiner et al., 2006; Tateda et al., 2003; Horikawa et al., 2006; Zimmermann et al., 2006). Así, se ha descrito que la AHL *N*-oxododecanoil-L-homoserín lactona (OC12-HSL) de *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir la respuesta inmune del huésped (Rice et al., 1999) y activar la producción de interleucina-8 (Zimmermann et al., 2006). Esto activa la respuesta inflamatoria por lo que actuaría como un factor de virulencia por sí mismo (Pesci e Iglewski, 1999; Smith e Iglewski, 2003). También se han observado efectos apoptóticos de la señal OC12-HSL sobre líneas celulares (Tateda et al., 2003; Horikawa et al., 2006; Shiner et al., 2006). Recientemente se ha demostrado que esta señal aumenta la apoptosis de las células germinales de *C. elegans* a través del aumento de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y de la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chen et al., 2018).

3.1 Quorum sensing y placa dental

De entre los procesos controlados por QS, uno de los de mayor impacto económico y clínico es la formación de biopelículas, que está altamente relacionada con los procesos infecciosos bacterianos. En el caso de la placa dental se han descrito varios procesos de QS. Se han identificado diferentes AIPs en patógenos orales Gram-positivos, como el péptido estimulador de la competencia (*competence-stimulating peptide*, CSP) presente en varios estreptococos orales. El CSP está involucrado en la formación de biopelícula, en la síntesis de bacteriocinas, en la autólisis y en la resistencia al estrés (Petersen et al., 2004; Senadheera y Cvitkovitch, 2008; Perry et al., 2009; Senadheera et al., 2009). También se ha observado que el gen responsable de la producción de la señal de QS tipo AI-2, LuxS, se encuentra conservado en una gran cantidad de bacterias, incluyendo numerosos patógenos orales como son *A. actinomycetemcomitans*, *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis* y *P. gingivalis* (Fong et al., 2001; Burgess et al., 2002; Merritt et al., 2003; McNab et al., 2003; Rickard et al., 2006). La presencia de AI-2 se ha confirmado en cultivos puros de bacterias patógenas como *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis* o *F. nucleatum* mediante el uso de biosensores (Frias et al., 2001). Varios estudios sugieren un papel clave de esta molécula de QS en la formación de la placa dental. Por ejemplo, AI-2 es esencial para la formación de la biopelícula formada por *Actinomyces naeslundii* y *S. oralis* en co-cultivos cuya única fuente de nutrientes es la saliva (Rickard et al., 2006), los cuales son incapaces de crecer en monocultivo. La adición externa de la señal AI-2 parcialmente purificada obtenida de *F. nucleatum* también afecta a la formación de biopelícula en cultivos

mono especie, así como cultivos mixtos de *P. gingivalis*, *T. denticola* y *Tannerella forsythia*, produciendo más biomasa, siendo más gruesas y favoreciendo la coagregación entre bacterias (Jang et al., 2013). En *A. actinomycetemcomitans*, especie asociada con periodontitis severa, AI-2 regula tanto los factores de virulencia como la formación de biopelícula (Novak et al., 2010). Importantes patógenos orales como *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* producen y reciben señales de QS de tipo AI-2 en concentraciones mayores que las bacterias comensales de la placa dental (Rickard et al., 2006). Estos altos niveles de AI-2 acelerarían el crecimiento de los patógenos orales y reducirían el de las bacterias comensales. Además, la presencia de la señal AI-2 producida por *F. nucleatum* aumenta la colonización de periodontopatógenos como *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia* (Jang et al., 2013), lo que contribuiría a la formación de placa subgingival y a la transición de una comunidad microbiana comensal a una patogénica (Kolenbrander et al., 2006).

Los sistemas de QS conocidos que regulan la formación de la placa dental en *S. mutans* son dos: el sistema específico de estreptococos, que es mediado por el péptido estimulador de la competencia (CSP) (Li et al., 2001, 2002) y el regulado por la señal AI-2 (Merritt et al., 2003), que como se comentó anteriormente sirve como señal “universal”. Estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la comunicación bacteriana mediada por el CSP regula la formación de biopelícula en miembros del género *Streptococcus* y que la inactivación de cualquiera de los cinco genes del *loci com*, responsable de la producción, secreción y detección del CSP se traduce en una biopelícula con un menor espesor y una estructura alterada (Li et al., 2002). Por otro lado, las moléculas de AI-2 son un factor importante en la colonización temprana de la superficie del diente ya que regulan la expresión de genes relacionados con la formación de placa dental y ayudan a controlar el gasto de energía en un ambiente tan extremadamente competitivo como es la cavidad oral. Los mutantes de *luxS* de *S. mutans*, son capaces de formar biopelícula, pero esta presenta diferencias notables en su estructura: una organización más heterogénea y unos agregados celulares más grandes (Merritt et al., 2003). Sin embargo, *luxS* también tiene un papel metabólico muy importante siendo crucial en el metabolismo de la metionina, en el reciclaje de la homocisteína y en la acumulación de intermediarios de la s-adenosil metionina (SAM) (Pereira et al., 2013) y participa también en la síntesis de proteínas, de ARN y de ADN (Sztajer et al., 2008). Por lo tanto, los efectos observados cuando se muta este gen deben de interpretarse con cautela.

Aunque se ha identificado la producción de moléculas de QS tipo AIPs y AI-2 en diferentes bacterias patógenas de la cavidad oral (Fong et al., 2001; Burgess et al., 2002; Merritt et al., 2003; McNab et al., 2003; Petersen et al., 2004) no se han encontrado señales tipo AHLs en bacterias orales (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002) hasta muy recientemente y solamente en bacterias que no son consideradas parte de la microbiota residente (Yin et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2013; Goh et al., 2014, 2016). Por ello, desde el trabajo pionero de Frias et al., (2001), que no detectó la presencia de AHLs usando biosensores, se ha tomado como paradigma la ausencia de bacterias patógenas de relevancia productoras de señal tipo AHL en la cavidad bucal. La presencia de cepas procedentes de la superficie de la lengua, de la placa dental y de lesiones cariogénicas con capacidad de producir distintas AHLs se ha considerado como algo anecdótico (Yin et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2013; Goh et al., 2014, 2016) descartándose un papel relevante del sistema de QS mediado por AHLs en la formación de la placa dental. Sin embargo, el trabajo pionero de Frias et al., (2001) presenta varios problemas metodológicos: 1) la alta especificidad de la bacteria biosensora utilizada *V. harveyii* BB886 que solo puede detectar un número limitado de AHLs de cadena corta; 2)

se obvió el efecto del medio de cultivo y las condiciones utilizadas, que como se ha visto recientemente en trabajos anteriores (Mayer et al., 2018; Muras et al., 2018a; Girard et al., 2019) puede ser clave en la producción de moléculas tipo AHLs; 3) la posibilidad de que otras bacterias no patógenas de la cavidad oral produzcan las AHLs que puedan detectar los patógenos mediante receptores huérfanos.

Como se comentó anteriormente, se considera a la bacteria Gram-negativa *P. gingivalis* como uno de los principales responsables del desarrollo de la enfermedad periodontal. A pesar de que no se ha podido detectar la producción de AHLs en esta bacteria patógena (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002; Asahi et al., 2010), existen algunos trabajos previos que han intentado relacionar de alguna forma el papel de este tipo de señales de QS con el posible desarrollo de la enfermedad periodontal. Para ello se ha observado el efecto de la adición de señales tipo AHL y moléculas análogas sobre varios fenotipos. Por ejemplo, se ha visto que al añadir AHLs al medio de cultivo, las células planctónicas de *P. gingivalis* modifican tanto su crecimiento como su expresión proteica (Komiya-Ito et al., 2006). Esta respuesta de *P. gingivalis* ante algunos tipos de AHLs sugiere la presencia de al menos un receptor huérfano tipo LuxR. Además, también se ha visto que moléculas análogas a las AHLs reducen la formación de biopelícula en esta bacteria (Asahi et al., 2010).

En un estudio preliminar del grupo Aquabiotec de la USC se observó la presencia inequívoca de AHL en muestras de placa dental utilizando HPLC-MS (Mallo, 2009). La AHL más común en las 34 muestras de placa dental analizadas fue la molécula C8-HSL, la cual fue identificada en todas las muestras con una única excepción. Los datos mostraron lo que parece ser una asociación cualitativa y cuantitativa entre las patologías observadas y ciertas de AHLs. Las moléculas OC4, C6 y C12-HSL se encontraron frecuentemente en muestras procedentes de voluntarios sanos. Por el contrario, C14-HSL se detectó principalmente en muestras de voluntarios con caries, en las que además la cantidad de C12HSL fue mayor que la encontrada en individuos sanos. Por otro lado, parece que en la enfermedad periodontal hay un aumento de la cantidad de C8-HSL mientras que el resto de AHLs desaparecen. Aquellos voluntarios que padecen tanto caries como enfermedad periodontal mostraron una gran cantidad de C4-HSL y especialmente de C6-HSL (Mallo, 2009).

4. Quorum quenching

Dado la importancia ecológica de los sistemas de QS en las interacciones entre procariontas y también con eucariotas, tiene sentido que la naturaleza haya desarrollado mecanismos para silenciar estos sistemas de comunicación intercelular (Zapata et al., 2017). Esta habilidad para bloquear los sistemas de QS bacteriano es una estrategia ampliamente utilizada por todo tipo de organismos: bacterias (Dong y Zhang, 2005; Grandclément et al., 2016; Romero et al., 2015), algas marinas (Givskov et al., 1996), plantas terrestres (Gao et al., 2003) e incluso células de mamíferos (Camps et al., 2011). Tanto las bacterias competidoras como los huéspedes eucariotas tratan de impedir la comunicación bacteriana secretando enzimas capaces de destruir los autoinductores y/o produciendo antagonistas de los mismos. Estas estrategias pueden actuar también como mecanismos de autoregulación de los sistemas de QS propios, un mecanismo natural de defensa contra la producción de antibióticos reguladas por QS de otros microorganismos o el aprovechamiento de las moléculas señal como fuente de nutrientes (Grandclément et al., 2016; Zapata et al., 2017). Un punto clave de las estrategias de inhibición del QS es que, al no afectar a la viabilidad de las bacterias, e interferir solamente en la activación de genes de virulencia, se evitaría

una presión selectiva excesiva sobre ellas, retardando la aparición de las tan problemáticas resistencias. Por ello, los compuestos con capacidad para inhibir el QS constituyen una nueva generación de terapias antimicrobianas con aplicaciones en diversos campos, incluyendo la biomedicina, veterinaria, agricultura y acuicultura (Schauder y Bassler, 2001; LaSarre y Federle, 2013; Romero et al., 2015; Grandclément et al., 2016). Incluso han surgido empresas cuyo objetivo es el desarrollo de compuestos anti-*quorum sensing* (Hentzer y Givskov, 2003).

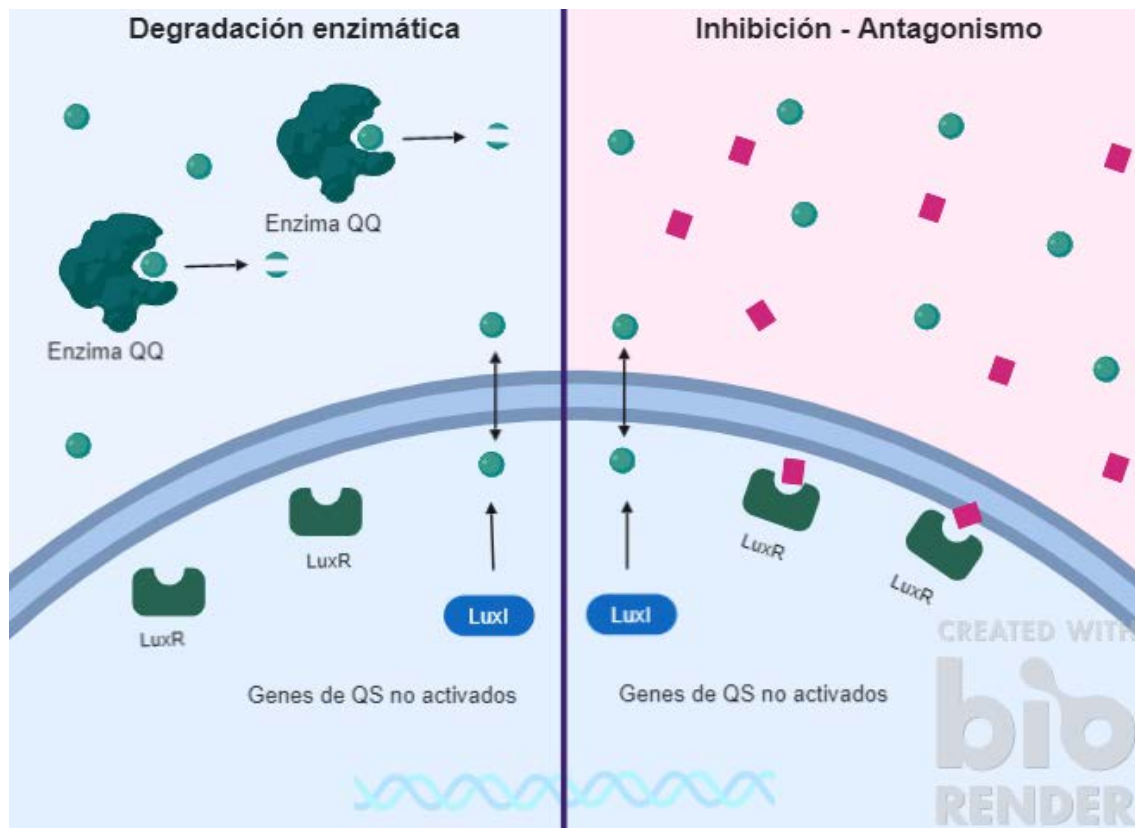


Figura 9. Las estrategias más comunes de *quorum quenching* son la disminución de la concentración de la señal de QS a través de mecanismos enzimáticos y el bloqueo de la transducción de la señal por la presencia de otra molécula que interfiere con el receptor.

El término *quorum quenching* (QQ) se acuñó en un primer momento para referirse a la inactivación enzimática de las señales de QS tipo AHLs (Dong et al., 2001), aunque a día de hoy muchos autores emplean este término para denominar a cualquier tipo de interferencia con los sistemas de QS (Kjelleberg et al., 2008). La mayor parte de los estudios sobre las estrategias de QQ se centran en los procesos mediados por AHLs. A pesar del interés existente en la identificación de inhibidores de QS (IQS) mediados por AI-2, existen pocos trabajos en este campo, probablemente debido a las limitaciones en los bioensayos disponibles para su identificación (Vilchez et al. 2007). Existen varios tipos de estrategias de QQ posibles:

- 1. El bloqueo de la generación de la señal.** Este debería ser el método más eficaz de interceptación de la comunicación bacteriana, pero existen pocos trabajos que hayan estudiado esta estrategia. Se ha observado una reducción en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* cuando se mutan los genes *lasI* (homólogo de *luxI*) y *lasR* (homólogo de *luxR*) (Parsek y Greenberg, 2000; Shih y Huang, 2002). También se ha visto que la administración de antibióticos macrólidos en concentraciones no letales produce un efecto inhibitorio sobre la síntesis de AHLs (Tateda et al., 2001; Pechere, 2001) aunque no está

claro el mecanismo de inhibición de estos compuestos sobre la producción de señales AHL (Pechere, 2001).

2. La disminución de la concentración de la señal activa en el medio (Figura 9). Esto puede realizarse por mecanismos enzimáticos y/o a una degradación espontánea por hidrólisis alcalina a pHs elevados (Yates et al., 2002). Se ha descrito la capacidad de degradar AHLs mediante actividad enzimática en una gran cantidad de bacterias de origen terrestre (Dong y Zhang, 2005) y marino (Romero et al., 2011, 2012b; Muras et al., 2018a), por lo que estos microorganismos pueden ser utilizados en el bloqueo de comunicación bacteriana y sus enzimas tienen gran interés para su uso en aplicaciones biotecnológicas. Debido a que el término QQ se utilizó por primera vez para describir este mecanismo, algunos autores restringen su uso a la degradación enzimática de la señal.

3. El bloqueo de la transducción de la señal de QS mediante la interferencia de la unión de la señal a su receptor (Figura 9). Antagonistas competitivos similares estructuralmente a las señales se unirían al receptor para bloquearlo. Las señales no afines al receptor también pueden actuar como inhibidores. Así, en el caso de la cadena acil de las AHLs, se ha visto que una reducción o aumento del tamaño de la cadena de la señal de *Erwinia carotovora* en únicamente una unidad metil redujo la actividad de la señal en un 90% y 50% respectivamente (Chhabra et al., 1993).

4.1 Antagonistas de moléculas de *quorum sensing*

Se ha observado que muchos organismos incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales producen inhibidores de QS (IQS). Sin embargo, la principal fuente natural de estos inhibidores se ha encontrado en plantas (Kalia, 2013; Grandclément et al., 2016) y en micro- y macroalgas (Natrah et al., 2011). En el medio marino, una gran parte de los IQS son producidos por corales blandos y esponjas, aunque otros organismos marinos también son capaces de sintetizar diferentes moléculas con este tipo de actividad (Skindersoe et al., 2008; Dobretsov et al., 2011).

El primer fenómeno conocido de antagonistas de QS mediado por AHL es un sistema desarrollado por un organismo eucariota, el alga roja *Delisea pulchra*. En varios estudios se demostró que las furanonas halogenadas producidas por esta alga, cuya estructura es muy próxima a las de las AHLs (Figura 10), actúan como antagonistas bloqueando los receptores de AHLs (Givskov et al., 1996; Kjelleberg et al., 1997; Manefield et al., 1999) y facilitando su degradación proteolítica (Manefield et al., 2002). Aunque en un primer momento el uso de las furanonas como agentes naturales anti-bioincrustación y su posible aplicación en el tratamiento y prevención en enfermedades de peces presentaba un gran interés, se ha descrito que presentan una elevada toxicidad debido probablemente a su carácter halogenado (Marsh et al., 2004).

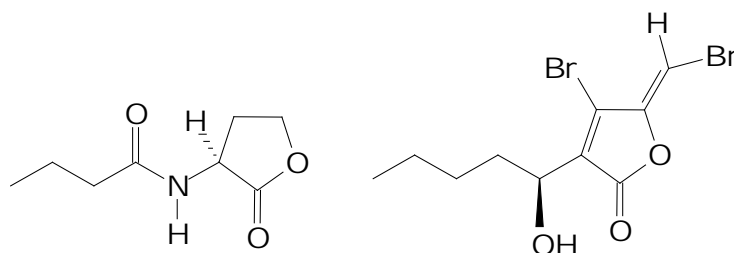


Figura 10. Estructura de una *N*-acilhomoserín lactona (izquierda) y de una furanona (derecha) producida por el alga roja *Delisea pulchra*.

A pesar de la elevada actividad de QQ enzimático encontrada en bacterias, la producción de IQS de origen bacteriano ha sido muy poco explorada. Algunos ejemplos de este tipo de actividad son las moléculas N-(2-feniletíl)-isobutiramida y 3-metil-N-(2-feniletíl)-butimamida producidas por la bacteria marina *Halobacillus salinus* (Teasdale et al., 2009) y la protoanemonina (4-metilenebut-2-en-4-olido) producida por *Pseudomonas* sp. B13 y *P. reinekei* MT1 (Bobadilla Fazzini et al., 2012). En cambio, la presencia de IQS se ha descrito en una gran cantidad de plantas (Kalia, 2013), algunas de ellas tan comunes como el arándano (LaPlante et al., 2012), la vainilla (Choo et al., 2006) o el ajo (Rasmussen et al., 2005). De hecho, este último contiene al menos tres antagonistas de AHL capaces de interferir con LasR de *P. aeruginosa*, haciendo que sus biopelículas sean más susceptibles a los antibióticos y a los detergentes (Persson et al., 2005).

Debido a la elevada especificidad de algunos receptores de AHLs, algunas de estas moléculas señal también pueden actuar como IQS en ciertos casos. Por ejemplos algunas AHLs con cadena larga (más de 10 carbonos) pueden actuar como antagonistas de AHLs de cadena corta (McLean et al., 2004). Sin embargo, este bloqueo de la comunicación bacteriana en el cual se utilizaron moléculas de AHLs de cadena larga como antagonistas en procesos de infección, está fuertemente limitada, ya que como se comentó anteriormente, algunas AHLs poseen potentes efectos moduladores sobre el sistema inmune.

Además de la obtención de IQS a partir de búsquedas aleatorias en extractos de diferentes organismos, existen numerosos estudios basados en el diseño específico de antagonistas del receptor LuxR mediante la modificación estructural de AHLs. Estas modificaciones se han realizado sobre la cadena lateral de las AHLs, el anillo HSL o sobre ambos (Ni et al., 2009). Sin embargo, se observó que en aquellos casos en los que la modificación logró presentar una actividad antagonista, esta era específica para el receptor cuya AHL fue modificada (Ni et al., 2009). Otra estrategia que se ha desarrollado para obtener IQS se basa en el diseño artificial de los mismos, ya sea mediante la síntesis de un precursor análogo o de un análogo identificado previamente como inhibidor (Grandclément et al., 2016). Por ejemplo, la modificación estructural de furanonas halogenadas naturales (Galloway et al., 2011) mostró efectos terapéuticos favorables en infecciones de pulmón de ratón con *P. aeruginosa* (Wu et al., 2004) y en infecciones de trucha con el patógeno *V. anguillarum* (Rasch et al., 2004).

4.2 Degradación enzimática de moléculas de *quorum sensing*

En la naturaleza se han observado diversos sistemas de inactivación enzimática de las moléculas de QS. Estos han surgido tanto en los hospedadores para impedir la colonización bacteriana, como dentro de las propias poblaciones microbianas como una estrategia de competencia para luchar con otras bacterias. De esta forma, las enzimas de QQ podrían cumplir cuatro tipos de funciones (Grandclément et al., 2016): 1) afinar las funciones mediadas por los sistemas de QS; 2) reciclar las moléculas de QS; 3) detoxicación y 4) la interferencia de los sistemas de QS de otras bacterias para obtener una ventaja competitiva.

La estructura química de las AHLs implica que su degradación enzimática podría ocurrir mediante cuatro reacciones diferentes (Figura 11A). Dos de ellas implicarían la rotura del anillo lactona HSL y estarían mediadas por enzimas tipo lactonasa o descarboxilasa. Las otras dos reacciones posibles separarían el ácido graso del anillo lactona HSL mediante la acción de una acilasa (amidasa) o una deaminasa (Dong y Zhang, 2005) (Figura 11B).

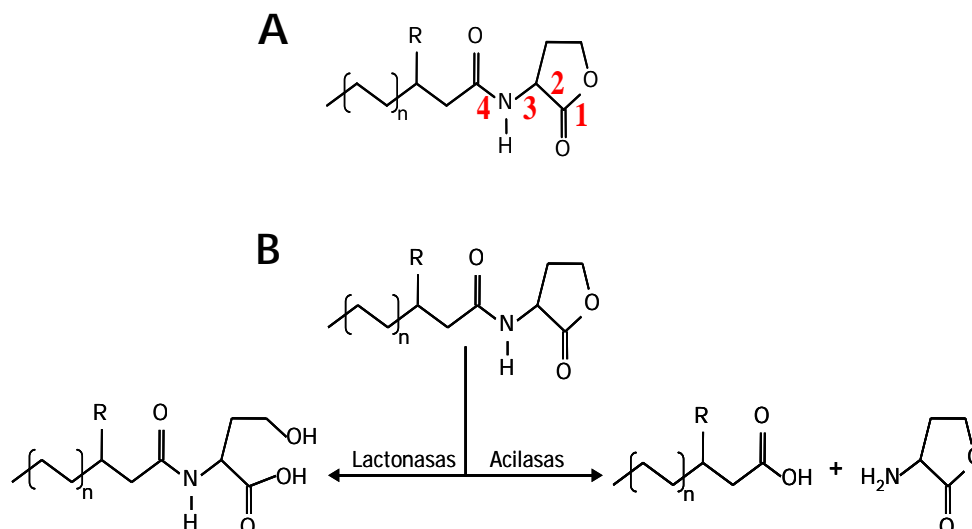


Figura 11. A) Cuatro posibles modos de degradación enzimática de AHLs. Los números en rojo indican la posición de corte de las enzimas: 1) Lactonasa; 2) Descarboxilasa; 3) Deaminasa y 4) Acilasa. B) Modo de acción de los dos tipos principales de enzimas de QQ conocidos. Las lactonosas hidrolizan el anillo HSL de la AHL mientras que las acilasas rompen el enlace amida entre el anillo HSL y el ácido graso.

Los primeros estudios sobre los procesos de QQ enzimático se realizaron con bacterias aisladas a partir de muestras de suelo y rizosfera. Estos estudios mostraron que entre el 2-4,8% de las cepas bacterianas tenían la habilidad para interferir con los sistemas de QS mediados por AHLs (Dong et al., 2002; D'Angelo et al., 2005). Sin embargo, estudios recientes han indicado que la presencia de este tipo de cepas es mucho mayor en diferentes ambientes marinos (2-46%): corales (Tait et al., 2010; Golberg et al., 2013), esponjas (Saurav et al., 2016), biopelículas marinas (Romero et al., 2011), agua de mar superficial, profunda y agua de estuario (Romero et al., 2012b; Linthorne et al., 2014; Muras et al., 2018a), o también en criaderos de bivalvos y peces (Torres et al., 2013, 2016). Además, esta mayor importancia del QQ en el medio marino ha sido confirmada por análisis metagenómicos (Romero et al., 2012b; Muras et al., 2018a). El creciente número de mecanismos de inactivación de QS descubiertos y la diversidad taxonómica de especies con capacidad QQ en la naturaleza, especialmente en el medio marino, dan idea de la importancia ecológica de los procesos de QS y la ventaja competitiva que estos comportamientos coordinados suponen para las especies bacterianas que los utilizan.

Los primeros enzimas descritos capaces de degradar las AHLs fueron de tipo lactonasa, que inactivan la molécula señal al hidrolizar el anillo de HSL (Figura 11B). El gen responsable que codifica para esta enzima lactonasa aislado de una cepa de *Bacillus* recibió el nombre de *aiiA* (*AutoInducer Inactivator*). En muchas bacterias se han descubierto secuencias homólogas de AiiA que comparten una elevada homología entre ellas (>90%). La mayoría de estas lactonosas homólogas AiiA pertenecen al género *Bacillus* (Dong et al., 2002; Lee et al., 2002; Cao et al., 2012) pero también se han identificado en otros géneros como *Enterobacter* o *Citrobacter* (Rajesh y Rai, 2014a, b; Torabi Delshad et al., 2018).

Las diferentes lactonosas con actividad QQ descritas se han clasificado principalmente dentro de tres grupos (Tabla 2): la superfamilia de las metalo- β -lactamasas (MBL) (Dong et al., 2002; Bebrone, 2007), la familia de las fostriesteresas (PTE) y la familia de las α/β hidrolasas. De entre todas las lactonosas que se han identificado hasta el momento, el mayor número de ellas pertenece a la superfamilia MBL. Aunque las primeras de estas lactonosas ya fueron identificadas hace 15 años: AiiA de *Bacillus* sp., AhlD de *Arthrobacter* (Park et

al., 2003), AhIK de *Klebsiella pneumoniae* (Park et al., 2003) y AttM y AiiB de *A. tumefaciens* (Zhang et al., 2002; Carlier et al., 2003); a día se hoy se siguen encontrando nuevas lactonasas que pertenecen a esta superfamilia de las MBL, pero presentan baja homología con otras descritas previamente. Por ejemplo, recientemente se han descrito las lactonasas Aii20J de *Tenacibaculum* sp. 20J (Mayer et al., 2015), A1S_0383, A1S_1876 y A1S_2662 de *Acinetobacter baumannii* ATCC17879 (Mayer et al., 2018), AiiK de *Kurthia huakuii* LAM0618T (Dong et al., 2018) y AaL de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Bergonzi et al., 2018), y SphiA de *Sphingopyxis* sp. 2E12 (Parga, 2019). Algunas de ellas con características que las hacen biotecnológicamente más interesantes que AiiA.

Tabla 2. Lactonasas descritas con actividad QQ (modificada de Romero et al., 2015).

Especie	Enzima	Familia	Autores	Grupo
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	AiiS* OpdA*	PTE	Uroz et al., 2009	α-Proteobacteria
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AiiB AttM	MBL MBL	Carlier et al., 2003 Zhang et al., 2002	
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>	MIM-1	MBL	Miraula et al., 2016	
<i>Ruegeria mobilis</i> YJ3	RmmL	MBL	Cai et al., 2018	
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	QsdR1 DihR	MBL Dielenactona hidrolasa	Krysciak et al., 2011	
<i>Sphingomonas ursincola</i> A1	qsdS	MBL	Morohoshi et al., 2017	
<i>Sphingopyxis</i> sp. 2E12	SphiA	MBL	Parga, 2019	
<i>Ochrobactrum</i> sp.	AidH	α/B hidrolasa	Mei et al., 2010	
<i>Acinetobacter baumannii</i> clinical isolate	AidA	α/B hidrolasa	López et al., 2017	γ-Proteobacteria
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC17879	A1S_0383 A1S_1876 A1S_2662	MBL MBL MBL	Mayer et al., 2018	
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i> CIP110306	AidE	MBL	Liu et al. 2017	
<i>Acinetobacter radioresistens</i> 40q	AiiA	MBL	Torabi Delshad et al., 2018	
<i>Citrobacter gillienii</i> 10q	AiiA	MBL	Torabi Delshad et al., 2018	
<i>Enterobacter aerogenes</i> VT66	AiiA	MBL	Rajesh y Rai, 2014b	
<i>Enterobacter asburiae</i> strain PT39	AiiA	MBL	Rajesh y Rai, 2014a	
<i>Enterobacter hormaechei</i> 5q	AiiA	MBL	Torabi Delshad et al., 2018	
<i>Enterobacter ludwigii</i> VT70	AiiA	MBL	Rajesh y Rai, 2014b	
<i>Enterobacter</i> sp. CS66	AiiE	MBL	Shastri et al., 2018	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AhIK	MBL	Park et al., 2003	
<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i>	QsdH	GDSL hidrolasa	Huang et al., 2012	
<i>Pseudomonas diminuta</i>	PTE	PTE	Afriat et al., 2006	
<i>Simidiua agarivorans</i>	MIM-2	MBL	Miraula et al., 2016	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 2q	AiiA	MBL	Torabi Delshad et al., 2018	

Tabla 2. Lactonasas descritas con actividad QQ (modificada de Romero et al., 2015) (Continuación).

Especie	Enzima	Familia	Autores	Grupo
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	AaL	MBLI	Bergonzi et al., 2018	Firmicutes
<i>Bacillus firmus</i> PT18	AiiA	MB	Rajesh y Rai, 2014a	
<i>Bacillus</i> sp.	AiiA	MBL	Dong et al., 2000; 2002	
<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> YS-8	GcL	MBL	Seo et al., 2011; Bergonzi et al., 2016	
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	GKL	PTE	Chow et al., 2010	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain 10	GsP	PTE	Hawwa et al., 2009a	
<i>Kurthia huakuii</i> LAM0618T	AiiK	MBL	Dong et al., 2018	
<i>Lysinibacillus</i> sp. Gs50	AdeH	MBL	Garge y Neurkar, 2016	
<i>Planococcus</i> sp. L10.15	AidP	MBL	See-Too et al., 2017	
<i>Solibacillus silvestris</i> StLB046	AhIS	MBL	Morohoshi et al., 2012	
<i>Thermaerobacter nagasakiensis</i> JCM 10246	AiiT	MBL	Morohoshi et al., 2015	
<i>Arthrobacter</i> sp. IBN110	AhID	MBL	Park et al., 2003	Actinobacteria
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i> k-10	MCP	PTE	Chow et al., 2009	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> C3	PPH	PTE	Afriat et al., 2006	
<i>Microbacterium testaceum</i> StLB037	AiiM	α/β hidrolasa	Wang et al., 2010	
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	QsdA** AhiA**	PTE	Park et al., 2006; Uroz et al., 2008 Afriat et al., 2006	
<i>Chryseobacterium</i> sp. StRB126	AidC	MBL	Wang et al., 2012	Bacteroidetes
<i>Flaviramulus ichthyenteri</i> Th78(T)	FiaL	MBL	Zhang et al., 2015	
<i>Maribacter ulvicula</i> 20L	Aii20L	MBL	Rey, 2015	
<i>Muricauda olearia</i> Th120	MomL	MBL	Tang et al., 2015	
<i>Tenacibaculum</i> sp. 20J	Aii20J	MBL	Mayer et al., 2015	
<i>T. aestuarii</i> JCM 13491T	AiiTA	MBL	Mayer et al., 2015	
<i>T. discolor</i> DSM 18842T	AiiTD	MBL	Mayer et al., 2015	
<i>T. gallaicum</i> CECT 7122T	AiiTG	MBL	Mayer et al., 2015	
<i>T. lutimaris</i> DSM 16505T	AiiTL	MBL	Mayer et al., 2015	
<i>T. soleae</i> CECT 7292T	AiiTS	MBL	Mayer et al., 2015	
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	DrOPH*** Dr0930*** QqIR	PTE MBL	Hawwa et al., 2009b Xiang et al., 2009 Koch et al., 2014	Deinococcus- Thermus
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	SacPox	PTE	Porzio et al., 2007	Archea, Crenarchaeota
<i>Sulfolobus islandicus</i>	SisLac	PTE	Hiblot et al., 2012	
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	SsoPox	PTE	Merone et al. 2005; Ng et al., 2011	
<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28	VmoLac	PTE	Hiblot et al., 2013	
<i>Homo sapiens</i> (hígado)	PON1	Paraxonasa	Draganov et al., 2005	Mamíferos
<i>Homo sapiens</i> (varios tejidos)	PON2	Paraxonasa		
<i>Homo sapiens</i> (hígado y riñón)	PON3	Paraxonasa		

*Parejas de enzimas descritos en una misma bacteria que a pesar de tener nombres diferentes probablemente son la misma molécula.

A pesar de que parecen ser menos frecuentes, también se han identificado numerosas lactonasas pertenecientes a la familia PTE (Tabla 2): QsdA de cepas de *Rhodococcus* (Park

et al., 2006; Uroz et al., 2008), GsP de *Geobacillus stearothermophilus* (Hawwa et al., 2009a), GKL de *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (Chow et al., 2010), SsoPox de *Sulfolobus solfataricus* (Merone et al., 2005; Ng et al., 2011), MCP de *Mycobacterium avium* (Chow et al., 2009), PPH de *Mycobacterium tuberculosis* C3 (Afriat et al., 2006), SisLac de *Sulfolobus islandicus* (Hiblot et al., 2012) y VmoLac de *Vulcaniseta moutnovskia* 768-28 (Hiblot et al., 2013).

La familia de las α/β hidrolasas con actividad QQ es la que cuenta con un menor número de representantes descritos (Tabla 2): AidH de *Ochrobactrum* T63 (Mei et al., 2010), AiiM de *Microbacterium testaceum* StlB037 (Wang et al., 2010) y AidA presente en varios aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii* (López et al., 2017). También se han descrito dos lactonasas que no pertenecen a ninguna de las familias previamente descritas: QsdH, incluida en un extremo de la proteína de expulsión de antibióticos de tipo RND en *Pseudoaltermonas byunsanensis* 1A01261 y perteneciente a la familia hidrolasa tipo GDSL (Huang et al., 2012); y HqiA, identificada en un metagenoma de suelo hipersalinio, relacionada con el grupo de las cisteína hidrolasas (CHase) (Torres et al., 2017).

Algunas lactonasas como MomL (Tang et al., 2015) y AiiA (Momb et al., 2008; Liu et al., 2013) presentan preferencia por las AHLs de cadena larga mientras que AidP (See-Too et al., 2017) y AiiK (Dong et al., 2018) son más activas contra AHLs de cadena media. En cambio, las lactonasas AaL (Bergonzi et al., 2018), Aii20J (Mayer et al., 2015) y GcL (Seo et al., 2011; Bergonzi et al., 2016) son capaces de inactivar desde señales cortas hasta señales largas. Además, algunas lactonasas muestran actividad enzimática en un amplio grado de temperaturas (20-50°C) como AidC (Wang et al., 2012), AiiK (Dong et al., 2018), MomL (Tang et al., 2015) y RmmL (Cai et al., 2018). Aunque dentro de las lactonasas de la superfamilia MBL destacan Aii20J (Mayer et al., 2015), AiiT (Morohoshi et al., 2015) y GcL (Seo et al., 2011; Bergonzi et al., 2016) por su termoestabilidad dado que siguen siendo activas después de someterlas a temperaturas mayores de 70°C, las lactonasas de la familia PTE como SsoPox, GsP, SisLac y VmmoLac han demostrado ser proteínas hipertermoestables al mantener su actividad superados los 90°C de temperatura (Del Vecchio et al., 2009; Hawwa et al., 2009a; Hiblot et al., 2012; Kallnik et al., 2014).

El otro tipo de enzimas inactivadoras de QS, las acilasas, fue identificado por primera vez en la bacteria Gram-negativa aislada del suelo *Variovorax paradoxus*. Esta bacteria puede utilizar las AHLs como única fuente de energía y nitrógeno (Leadbetter y Greenberg, 2000). Esto confirmaría la importancia ecológica de los sistemas de QS, pues indica que se han desarrollado sistemas altamente específicos de inactivación y aprovechamiento de estas señales. Como se comentó anteriormente, las acilasas son un tipo de enzima que rompe el enlace amida entre la HSL y el ácido graso (Figura 11B), el cual puede ser utilizado como fuente de energía. Aunque cada vez se descubren más enzimas con actividad acilasa en la naturaleza, sigue habiendo un mayor número de lactonasas descritas.

A día de hoy se han identificado numerosas acilasas en varias cepas bacterianas (Tabla 3), incluyendo los géneros *Acidovorax* (MacQ), *Acinetobacter* (AmiE), *Agrobacterium* (AtPVA), *Brucella* (AibP) y *Shewanella* (Aac), entre otros. Además, se ha observado que algunas bacterias producen varias acilasas como *Ralstonia* (AaC y AiiD) y *Streptomyces* (AhlM y SIPVA). Incluso *P. aeruginosa* PAOI presenta tres acilasas diferentes, PvdQ, QuiP y HacB, con las que podría regular su sistema de QS (Huang et al., 2003, 2006; Wahjudi et al., 2011). Todas las acilasas identificadas hasta el momento pertenecen a la superfamilia Ntn-hidrolasa, con la única excepción de AiiO de *Ochrobactrum* sp. A44 que está incluida dentro de la familia de las α/β hidrolasas.

Tabla 3. Acilasas descritas con actividad QQ (modificada de Utari et al., 2017).

Especie	Enzima	Familia	Autores	Grupo	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AtPVA	Ntn-hidrolasa	Sunder et al., 2016	α -Proteobacteria	
<i>Ochrobactrum</i> sp. A44	AiiO	α /B hidrolasa	Czajkowski et al., 2011		
<i>Acidovorax</i> sp. MR-S7	MacQ	Ntn-hidrolasa	Kusada et al., 2017	β -Proteobacteria	
<i>Brucella melitensis</i>	AibP	Ntn-hidrolasa	Terwagne et al., 2013		
<i>Comamonas</i> sp. D1	(n.d.)	Ntn-hidrolasa	Uroz et al., 2003		
<i>Ralstonia mannitolilytica</i> SDV	(n.d.)	Ntn-hidrolasa	Yang et al., 2006		
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	Aac	Ntn-hidrolasa	Chen et al., 2009		
<i>Ralstonia</i> sp. XJ12B	AiiD	Ntn-hidrolasa	Lin et al., 2003		
<i>Variovorax paradoxus</i> VAI-C	(n.d.)	Ntn-hidrolasa	Leadbetter y Greenber, 2000		
<i>Acinetobacter</i> sp. Oo24	AmiE	Ntn-hidrolasa	Ochiai et al., 2014	γ -Proteobacteria	
<i>Kluyvera citrophila</i>	KcPGA	Ntn-hidrolasa	Mukherji et al., 2014		
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	PaPVA	Ntn-hidrolasa	Sunder et al., 2016		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PvdQ QuiP HacB	Ntn-hidrolasa	Sio et al., 2006 Huang et al., 2006; Wahjudi et al., 2011 Wahjudi et al., 2011		
<i>Pseudomonas syringiae</i> B728a	HacA HacB	Ntn-hidrolasa	Shepherd y Lindow, 2009		
<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	(n.d.)	Ntn-hidrolasa	Uroz et al., 2003		
<i>Shewanella</i> sp.	(n.d.)	Ntn-hidrolasa	Tait et al., 2009		
<i>Shewanella</i> sp. MIB015	Aac	Ntn-hidrolasa	Morohoshi et al., 2008b		
<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	AiiC	Ntn-hidrolasa	Romero et al., 2008		Cianobacteria
<i>Streptomyces</i> sp. M664	AhIM	Ntn-hidrolasa	Park et al., 2005		Actinobacteria
<i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC13664	SIPVA	Ntn-hidrolasa	Torres-Bacete et al., 2015		
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	QqaR	Ntn-hidrolasa	Koch et al., 2014	Deinococcus-Thermus	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtFAAH	Ntn-hidrolasa	Palmer et al., 2014	Mamíferos	
<i>Sus</i> sp. (riñón de cerdo)	pAcy1	Ntn-hidrolasa	Xu et al., 2003		

Las especies bacterianas en las que se han descubierto enzimas de QQ contra las señales tipo AHLs pertenecen a seis phyla diferentes del reino *Bacteria* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>): Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Cianobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus (Tablas 2 y 3). Además de los miembros del dominio de las eubacterias se han descubierto varias arqueas capaces de producir enzimas de QQ (Tabla 2): SsoPox de *Sulfolobus solfataricus* (Merone et al., 2005; Ng et al., 2011), y SacPox de *Sulfolobus acidocaldarius* (Porzio et al., 2007), SisLac de *Sulfolobus islandicus* (Hiblot et al., 2012) y VmoLac de *Vulcanisaeta moutnovskia* 768-28 (Hiblot et al., 2013). Llama la atención que mientras en Bacteroidetes, Firmicutes y Archeas solo se han identificado lactonasas (Tabla 2), dentro de las β -Proteobacterias solo se han encontrado acilasas (Tabla 3). Además, las lactonasas encontradas en Bacteroidetes

solo pertenecen a la superfamilia de las MBL, mientras que las lactonasa de Archeas son todas de la familia PTE.

Se ha observado también que, aunque algunas bacterias no degradan la señal si que son capaces de modificar la cadena acil de las AHL por presentar actividad oxidasa-reductasa. Esta modificación podría afectar la especificidad y por tanto el reconocimiento de la molécula por su correspondiente receptor. La primera actividad oxidasa-reductasa identificada fue descrita en *Rhodococcus erythropolis* W2. Esta bacteria reduce la AHLs oxo-sustituidas en el tercer carbono a sus formas hidroxilo, por lo que tiene efecto sobre las AHL que no se encuentran oxo-sustituidas (Uroz et al., 2005). La segunda actividad fue descrita en *Bacillus megaterium* y la lleva a cabo la monooxigenasa P450, anteriormente caracterizada como molécula oxidadora de ácidos grasos y aminoácidos unidos a ácido graso. Esta enzima oxida AHLs de cadena larga en las posiciones ω -1, ω -2 y ω -3, siendo más activa sobre AHLs oxo-sustituidas (Chowdhary et al., 2007). También se ha podido detectar este tipo de actividad oxidasa-reductasa en la enzima BpiB09. Esta molécula identificada en un metagenoma obtenido de muestras de suelo es capaz de inactivar la señal OC12-HSL y reducir la formación de biopelícula de *P. aeruginosa*, así como otros fenotipos relacionados con el QS (Bijtenhoorn et al., 2011).

Además de numerosas bacterias, se ha encontrado que existen plantas y células de mamíferos que también pueden interferir con las señales AHL (Xu et al., 2003; Chun et al., 2004; Delalande et al., 2005). Por ejemplo, se han identificado unas proteínas con actividad QQ llamadas paraxonasas (PONs) que están altamente conservadas en vertebrados y sobretodo en mamíferos (Draganov et al., 2005) (Tabla 2). En humanos, la expresión de PON1 y PON3 se realiza principalmente en las células del hígado y de los riñones, pero PON2 se produce en diferentes tejidos (Draganov et al., 2005).

5. Aplicaciones biotecnológicas del quorum quenching

Debido a que el QS juega un papel clave en la regulación de numerosas funciones fisiológicas microbianas, incluyendo las relacionadas con la virulencia en bacterias patógenas, existe un gran interés en el diseño e implementación de estrategias de inactivación de estos sistemas de comunicación bacteriana (Schauder y Bassler, 2001; LaSarre y Federle, 2013; Romero et al., 2015; Grandclément et al., 2016). En el año 2011 había 45 tecnologías patentadas basadas en los mecanismos de inhibición del QS, la mayoría de ellas basadas en la interferencia con las AHLs, mientras que los casos de interferencia con otros tipos de señales como AI-2 y AIPs eran mucho menores, solamente 5 y 4 patentes respectivamente (revisado por Romero et al., 2012a). Aunque a día de hoy la búsqueda en las bases de datos Espacenet y *United States Patent and Trademark Office-Patent databases* muestran que solamente hay 7 nuevas patentes relacionados con la aplicación del QQ, el hecho de que en 2014 la Organización Mundial de la Salud advirtiera que la mayor amenaza para la salud pública mundial es la resistencia a los antibióticos, ha hecho que se incremente la búsqueda para el desarrollo de este tipo de terapias antimicrobianas alternativas. Mientras que los agentes antimicrobianos tradicionales provocan la muerte del patógeno, el uso de sistemas que interfieran con los receptores que detectan las señales de QS o con las señales en si mismas adoptaría una estrategia menos agresiva. Por lo tanto, esta aproximación basada en el QQ puede funcionar como una nueva terapia antimicrobiana.

Multitud de estudios ya han demostrado la viabilidad de las aplicaciones biotecnológicas del QQ en diferentes áreas que van desde la biomedicina hasta la acuicultura pasando por

la agricultura (Romero et al., 2015; Grandclément et al. 2016; Rémy et al., 2018). En esta última, la expresión de la enzima AiiA de *Bacillus* en la bacteria patógena *Pectobacterium carotovora* redujo significativamente los síntomas de infección causados por ésta en las plantas de patata, zanahoria, coliflor, tabaco, apio y berenjena (Dong et al., 2000). Otras lactonasa como AttM (Carlier et al., 2003), AiiB (Carlier et al., 2003), AiiM (Wang et al., 2010), AidH (Mei et al., 2010) o AhLS (Morohoshi et al., 2012) también mostraron buenos resultados para el biocontrol bacteriano en plantas también contra *P. carotovora*. Incluso algunas plantas han sido modificadas genéticamente para expresar lactonasa de QQ con el objetivo de comprobar si esta aproximación podría utilizarse para prevenir posibles infecciones bacterianas. Las primeras líneas transgénicas descritas de este tipo fueron plantas de tabaco y patata, a las que se les insertó el gen *aiiA* de *Bacillus* gracias a lo cual mostraron una mayor resistencia a la infección causada por *P. carotovora* (Dong et al., 2001). Otra estrategia que se ha probado en la agricultura es promover el crecimiento de bacterias con actividad QQ mediante el uso de bioestimulantes. Así, se ha observado que favorecer el crecimiento de bacterias degradadoras de AHLs, como *R. erythropolis*, permite un biocontrol de la actividad del patógeno *Pectobacterium atrosepticum* en patata (Cirou et al., 2012).

La aplicación biotecnológica del QQ en el campo de la acuicultura es especialmente interesante ya que el uso de antibióticos está fuertemente restringido y existen numerosos patógenos que coordinan la expresión de sus factores de virulencia mediante procesos de QS. Numeros estudios apoyan la viabilidad de esta estrategia. El uso de consorcios bacterianos con actividad degradadora de AHLs ha sido efectivo para la protección tanto del langostino *Macrobrachium rosenbergii* como del rotífero *Brachionus plicatilis* contra cepas patógenas de *V. harveyi* (Tinh et al., 2007; Nhan et al., 2010). También se ha observado una atenuación de la infección producida por *Aeromonas hydrophila* en pez cebra al añadir un *Bacillus* con la enzima AiiA (Chu et al., 2011) y en carpas al añadir directamente la lactonasa AiiA (Chen et al., 2010). Recientemente, se ha descrito que la presencia de la bacteria con actividad QQ *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 es capaz de reducir el daño tisular que sufre el coral *Oculina patagónica* cuando es infectado con *Vibrio mediterranei* (Torres et al., 2016). La lactonasa de *Bacillus* incluida como ingrediente funcional dentro del pienso para peces también fue capaz de reducir los efectos de la infección causada por el patógeno *A. hydrophila* (Cao et al., 2012).

En los últimos años se ha propuesto el uso de enzimas de QQ mediante administración directa (ya sea en humanos o animales) como una prometedora área para el desarrollo de tratamientos alternativos contra patógenos bacterianos. Algunos de estas enzimas de QQ ya han sido probadas lo que ha permitido comprobar la viabilidad de este tipo de administración. Incluso se ha estudiado la posibilidad de emplear algunos de las enzimas de QQ, como PvdQ o SsoPox, directamente en los pulmones del paciente al administrarlos mediante inhalación (Wahjudi et al., 2013; Hraiech et al., 2014). También se ha probado el uso tópico de una lactonasa purificada de *Bacillus* sp. ZA12 en ratones modelos quemados e infectados por *P. aeruginosa* PAO1. En este caso la inclusión de la lactonasa en un gel fue capaz de prevenir la difusión de la infección y de reducir la mortalidad, alcanzando una supervivencia del 100% al combinarlo con el antibiótico ciprofloxacina (Gupta et al., 2014).

Debido a que se ha demostrado, tanto en condiciones de laboratorio como en el medio natural, que se puede inhibir la formación de diferentes tipos de biopelículas por la degradación enzimática de las señales de QS implicadas (Rajamani et al. 2011; Oh et al. 2012), las estrategias de QQ presentan interesantes aplicaciones para prevenir la creación de dichas estructuras bacterianas. Dado que la base de la bioincrustación (*biofouling*) está

constituida por la formación de biopelículas microbianas en superficies sumergidas (Clare, 1996; Pasmore y Costerton, 2003), se ha sugerido el uso de las estrategias de QQ para prevenir este fenómeno (Dobretsov et al., 2009, 2011) que genera grandes pérdidas económicas en todo el mundo. Por ejemplo, el medio marino ha permitido el descubrimiento de una cepa marina de *Bacillus pumilus* con actividad QQ que inhibe fuertemente la formación de biopelícula de otras bacterias marinas (Nithya et al., 2010). Además, la formación de biopelículas en las membranas de los reactores que se utilizan en el tratamiento de aguas residuales es también un problema muy común en este tipo de instalaciones. Estas biopelículas suponen un incremento económico importante ya que influyen negativamente en la eficiencia del proceso y aumentan la energía consumida. Se ha demostrado con éxito que el uso de bacterias con actividad QQ es capaz de reducir esta biopelícula depositada en la membrana de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales (Yeon et al., 2009; Kim et al., 2011; Oh et al., 2012; Lade et al., 2014, Soler et al., 2018).

Con el objetivo de inhibir la formación de biopelículas y así prevenir la aparición de enfermedades infecciosas asociadas (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley y Stoodley, 2005), se han probado varias enzimas de QQ dentro del área de la biomedicina. El uso de la lactonasa Aii20J (Mayer et al., 2015) redujo la formación de biopelícula en la importante bacteria nosocomial *Acinetobacter baumannii* ATCC17978 y en diferentes aislados clínicos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*, así como también la motilidad de las mismas (López et al., 2017; Mayer, 2018). Siguiendo esta vía de investigación se ha probado que la expresión de AiiA en *Escherichia coli* es capaz de erradicar totalmente la formación de biopelícula de *V. cholerae*, agente causal del cólera. El desarrollo de la biopelícula le proporciona a este vibrio una mayor supervivencia en el medio ambiente acuático y en el interior del huésped (Augustine et al., 2010). La inmovilización de la enzima SsoPox en membranas de nanoaluminio redujo los factores de virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, demostrando el potencial uso de estas enzimas de QQ en dispositivos médicos (Ng et al., 2011). También se ha probado el uso combinado de una acilasa de QQ y una α -amilasa retenidas en un catéter urinario. Los resultados mostraron que esta combinación fue capaz de retrasar la formación de biopelícula en un modelo animal hasta 7 días (Ivanova et al., 2015).

Una de las principales limitaciones del uso de las acilasas es que se ha descrito que algunas de ellas aparte de ser capaces de degradar las AHL también actúan sobre los antibióticos. Recientemente se ha observado que MacQ no solo tiene actividad AHL-acilasa, sino que también es capaz de degradar un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos (penicilina G, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, cefalexina y cefadroxil) por lo que podría favorecer la resistencia a los antimicrobianos (Kusada et al., 2017). Otras acilasas como AhlM (Park et al., 2005) y KcPGA (Mukherji et al., 2014) también presentan esta doble actividad.

En cuanto a la aplicación de ISQ en Gram-positivas, algunas investigaciones para la reducción de la biopelícula en estas bacterias utilizando los mecanismos de QQ se han basado en que algunas cepas de las mismas especies producen AIPs que inhiben la expresión del sistema *agr* en otras cepas (Ji et al., 1997). Es decir, se ha observado una inhibición cruzada del sistema *agr* entre cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, siendo la inactivación sobre *S. aureus* mayor. Sin embargo, el bloqueo de la expresión de *agr* parece que puede inhibir o favorecer la formación de la biopelícula dependiendo de las condiciones de cultivo utilizadas (Abraham, 2006).

La utilización de moléculas inhibitoras/antagonistas de las señales de QS está mucho menos explorada que el QQ enzimático. Las furanonas producidas por el alga roja *Delisea pulchra*, capaces de inhibir los procesos de QS mediados por AHLs y AI-2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Givskov et al., 1996; Zang et al., 2009), han demostrado su eficacia para el tratamiento de enfermedades infecciosas en peces y crustáceos (Rasch et al. 2004; Defoirdt et al., 2006). Sin embargo, se ha observado que presentan una elevada toxicidad debido a su carácter halogenado. Además, los inhibidores serían más propensos a seleccionar una posible resistencia que las enzimas de QQ, porque necesitan interaccionar directamente con el receptor de las señales para actuar (Bzdrenga et al., 2016).

A pesar de que estas estrategias son mucho menos agresivas que el uso de antibióticos, ya que influyen sobre la virulencia del patógeno de modo que este no es capaz de adaptarse al ambiente del huésped y puede ser eliminado por las defensas de este, ya se han observado resistencia a la inhibición de QS tanto en bacterias de laboratorio como de la práctica clínica (Kalia et al., 2014). *In vitro*, el uso de adenosina como única fuente de carbono, que necesita de un sistema de QS activo, fue el método seleccionado para identificar una posible resistencia contra la IQS en *P. aeruginosa*. Cuando la furanona C-30 se añadía a los cultivos aparecían mutaciones que aumentaban la capacidad de las células para expulsar este inhibidor de QS a través de las bombas (Maeda et al., 2012). Sin embargo, debe de tenerse en cuenta la alta toxicidad de la furanona (Rasch et al., 2004). También se ha detectado la existencia de bacterias con mutaciones que las hacen resistentes a la IQS en pacientes con fibrosis quística, por lo que estas mutaciones ya existen en la naturaleza. A pesar de que algunos autores sugieren que existe el riesgo de la aparición de resistencias, por supuesto en mucha menor medida que en el caso de los antibióticos (Defoirdt et al., 2010; García-Contreras et al., 2016; Guendouze et al., 2017), se cree que el uso de enzimas de QQ, en lugar de IQS, haría menos probable la aparición de estas resistencias. Esto se debe a que las enzimas de QQ actúan de forma específica contra las señales de QS y de manera independiente sin llegar a entrar a las células. Los IQS, en cambio, necesitan interaccionar directamente con el receptor de las señales (Bzdrenga et al., 2016).

5.1 Uso de compuestos con actividad *quorum quenching* en salud bucodental

Se han propuesto numerosos compuestos de origen natural con la capacidad de inhibir biopelículas como agentes preventivos en la salud bucodental (Kouidhi et al., 2015) y en particular contra la placa cariogénica, biopelícula formada mayormente por *S. mutans* (Koo y Jeon, 2009; Liberio et al., 2011; da Cunha et al., 2013). Una gran cantidad de ellos proceden de plantas y su mecanismo de acción afecta principalmente a la formación de biopelícula producida por estreptococos, como los extractos obtenidos de *Morus alba*, *Schinus terebinthifolius*, *Croton urucana*, *Dioscorea altissima*, *Annona hypoglauca*, *Zingiber officinale* (Islam et al., 2008; Barbieri et al., 2014; Barnabe et al., 2014; Hasan et al., 2015), aceites esenciales de *Curcuma longa* y *Chrysanthemum boreale* (Lee et al., 2011; Kim et al., 2015) o ácido kaurenico de *Aralia continentalis* (Jeong et al., 2013). También se ha visto este tipo de actividad en lectinas, también obtenidas de plantas (Oliveira et al., 2007; Islam et al., 2009). Sin embargo, la actividad anti-biopelícula observada en estos casos suele deberse a una inhibición en el crecimiento bacteriano y sus efectos están asociados a una pérdida de la viabilidad celular que, como se comentó anteriormente, acabarían por facilitar la aparición de resistencias.

La degradación enzimática de las señales implicadas en la formación de biopelículas puede ser una estrategia a seguir para prevenir la formación de estas estructuras bacterianas, como se ha demostrado contra diferentes tipos de biopelículas *in vivo* e *in vitro* (Rajamani

et al., 2011; Oh et al., 2012). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas enzimas capaces de inhibir los procesos de comunicación bacteriana permitiría el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas. La degradación o inactivación de CSP podría usarse para alterar la estructura de la biopelícula de *S. mutans* y/o hacer que las bacterias dentro de la placa dental sean más accesibles a los tratamientos con detergentes y/o antibióticos. En los últimos años, ya se ha visto que las señales de QS, especialmente AI-2 en la cavidad oral, juegan un papel muy importante en la colonización temprana de la superficie del diente y la posterior formación de la placa dental. Además, se ha demostrado que la interferencia con la síntesis de la señal AI-2 tanto mediante la inactivación del gen responsable como a través del uso de inhibidores producen una alteración en la formación de la biopelícula. Un estudio previo mostró que la adición de la furanona C52 es capaz de inhibir la formación de biopelícula cariogénica producida por *S. mutans* a través de la interferencia con la señal AI-2 (Lönn-Stensrud et al., 2007). Sin embargo, un estudio posterior que utilizó la furanona C30 sugiere que este efecto de las furanonas sobre la formación de biopelícula de *S. mutans* se debe a un mecanismo desconocido pero que no guarda relación con el sistema de QS mediado por AI-2, pues el mutante de luxS también se vio afectado (He et al., 2012). Se ha demostrado que la utilización del compuesto natural sinefungin, que interfiere con la síntesis de la señal AI-2, produce una alteración de la estructura y una reducción en la formación de biopelícula en *S. pneumoniae* que es dependiente de la concentración (Yadav et al., 2014). También el uso combinado de la furanona con la D-ribosa mostró una inhibición de la biopelícula oral, así como del proceso de coagregación (Jang et al., 2013). Curiosamente, extractos de la planta *Achyranthes aspera*, que también presenta actividad QQ contra AHLs, mostraron actividad contra la cepa cariogénica *S. mutans* KMS07. Sin embargo, dicha actividad QQ no fue comprobada experimentalmente, sino que fue identificada *in silico* al predecir la producción de un compuesto con alta similitud a OC12-HSL (Murugan et al., 2013). El uso de extractos celulares de la bacteria *Tenacibaculum* sp. 20J redujo la formación de la biopelícula en *S. mutans* ATCC25175 (40-50%) probablemente a través de la interceptación de la señal AI-2 (Muras et al., 2018b). Este efecto inhibitorio también se pudo observar en las biopelículas formadas por las cepas *S. oralis* DSM20627 y *S. dentisani* 7747 (Muras et al., 2018b). Además, se han registrado varias patentes sobre el uso de compuestos con actividad QQ para el uso en el ámbito de la salud bucodental. Como la patente N°US8617523 de la compañía Colgate-Palmolive que utiliza un IQS para inhibir el crecimiento y la formación de biopelícula oral o la patente N°US20120189710 que se basa en una formulación con ajo que presenta actividad contra el QS, así como componentes antibacterianos y antiinflamatorios. De hecho, este último producto ya se distribuye y es usado por dentistas en el Reino Unido (Grandclément et al., 2016).



OBJETIVOS



Los principales objetivos de este trabajo fueron:

1. Aislamiento e identificación de nuevas bacterias marinas con actividad *quorum quenching*, con los siguientes subobjetivos:

1.1 Determinar la prevalencia de los procesos relacionados con las señales de *quorum sensing* tipo acil-homoserin lactonas en bacterias marinas.

1.2 Caracterización de los aislados obtenidos con alta actividad *quorum quenching* para evaluar su potencial uso biotecnológico.

2. Evaluar el uso de compuestos con actividad *quorum quenching* para la prevención y el tratamiento de enfermedades orales bacterianas, para lo cual se establecen los siguientes subobjetivos:

2.1 Determinar la prevalencia de los procesos relacionados con las señales de *quorum sensing* tipo acil-homoserin lactonas en muestras y bacterias orales.

2.2. Caracterización del efecto del extracto de *Tenacibaculum* sp. 20J sobre el sistema de *quorum sensing* mediado por AI-2 y su potencial uso para reducir la biopelícula cariogénica de *S. mutans*.

2.3 Caracterización del efecto de los procesos de *quorum sensing* y *quorum quenching* en biopelículas orales para evaluar el potencial uso biotecnológico de Aii20J en salud bucodental.





MATERIALES Y MÉTODOS



1. Cepas y medios de cultivo empleados

1.1 Cepas marinas

Los medios sólidos empleados para el aislamiento de las bacterias marinas fueron el agar de triptona y soja con 1% de NaCl (TSA-I, Panreac), agar marino (AM, Panreac), agar marino diluido 1/100 (AM 1/100), y agua de mar filtrada y autoclavada (FAS) suplementada con 0,5 g/L de polímeros agarosa, quitina y almidón (FAS-POL) (Romero et al., 2011). Las bacterias marinas aisladas se cultivaron rutinariamente en Caldo Marino (CM) y en Agar Marino (AM).

1.2 Cepas orales

Las cepas orales se cultivaron en los medios sólidos agar sangre Columbia (Scharlau) y agar Schaedler con sangre y vitamina K1 (Scharlau) mientras que como medio líquido se usó solamente Schaedler con sangre 5% y suplementado con 1 mg/L vitamina K1. Sin embargo, para los ensayos de producción de AHLs las bacterias se cultivaron en Schaedler suplementado con 1 mg/L vitamina K1, evitando la adición de la sangre debido a su actividad paraxonasa.

1.3 Bacterias biosensoras

Para la identificación de bacterias capaces de producir AHLs se utilizó la bacteria biosensora *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (Chilton et al., 1974; Shaw et al., 1997) que se cultivó en Luria-Bertani (LB) suplementado con gentamicina (30 µg/mL) o medio de *Agrobacterium* (AB) (Chilton et al., 1974).

Para la detección de bacterias capaces de interferir con los sistemas de QS mediados por AHLs se utilizaron como biosensores las cepas *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan et al., 1997) y VIR07 (Morohoshi et al., 2008a). Estas se cultivaron a 30°C en LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL).

Para la detección de la interceptación de la señal AI-2 se usó la cepa *V. harveyi* BB170 (HAI-1 negativo; AI-2 positivo; CAI-1 positivo) y la cepa *V. harveyi* JMH597 (HAI-1 negativo; AI-2 positivo; CAI-1 negativo) (Henke y Bassler, 2004). También se utilizó la bacteria *V. harveyi* JAF548, la cual tiene la producción de bioluminiscencia desacoplada de los sistemas de QS (Freeman y Bassler, 1999; Defoirdt y Sorgeloos, 2012). Estos vibrios se cultivaron a 30°C en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con kanamicina (30 µg/mL) y en medio de bioensayo de bioluminiscencia (BB) (Greenberg et al., 1979).

1.4 Formación de biopelículas

Se utilizaron las cepas *S. mutans* ATCC25175, *S. dentisani* 7747 y *S. oralis* DMS20627 como bacterias Gram-positiva patógenas formadoras de biopelícula. Estas se cultivaron a 37°C en el medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón Agar (BHIA, *Brain Heart Infusion Agar*) e Infusión Cerebro Corazón (BHI, *Brain Heart Infusion*) suplementado o no con 0,1% y 0,2% sacarosa y 0,1% y 0,2% glucosa.

Para la formación de biopelículas mixtas se utilizaron los siguientes medio de cultivo: 1) BHI; 2) BHI con 0,1% sacarosa; 3) BHI-2: BHI suplementado con mucina 2,5 g/L, extracto de levadura (1 g/L), cisteína (0,1 g/L), bicarbonato sódico (2 g/L), hemina (5mg/L), menadiona (1 mg/mL) y ácido glutámico 0,25% v/v (Sánchez et al., 2011); 4) saliva humana estéril al filtrarla por 0,2 µm ; 5) Schaedler (Scharlau) suplementado con

1 mg/L vitamina K ; 6) medio semidefinido tamponado McBain (McBain et al., 2005) que contiene 2.5 g/L mucina, 2 g/L Bacto peptona, 2 g/L tripticasa peptona, 1 g/L extracto de levadura, 0,35 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl₂, 1 mg/mL hemina, y 2 mg/L vitamina K1 con PIPES a pH 7.0, pudiendo estar suplementado con 0,2% sacarosa (biopelícula cariogénica) o suero fetal bovino 10% (FCS) (biopelícula periodontal).

2. Aislamiento y cuantificación de bacterias cultivables

2.1 Muestras de agua de mar

Para la detección de bacterias marinas con actividad QQ sobre el sistema de QS mediado por AHLs y se procedió al aislamiento de cepas procedentes de diferentes muestras de agua del mar Mediterráneo recogidas a 90 y a 2000 m de profundidad. La muestra de 90 m es considerada el límite de la zona fótica, con un valor de clorofila a (Chl-a) de 0,13 mg/m³, una cantidad de carbono orgánico (POC) de 1,35 mg C/L, 6,9 μM nitrógeno, 0,25 μM de fosfato y un recuento de 1,37 x 10⁵ bacterias heterótrofas/ mL. La muestra de 2000 m se caracterizó por una concentración casi indetectable de Chl-a (0,01 mg/m³), menor POC (0,94 mg C/L), mayores valores de N y P (8,62 y 0,5 μM) y menor cantidad de bacterias heterótrofas (4,5 x 10⁴ UFC/mL) (López-Pérez et al., 2017; Haro-Moreno et al., 2018).

Los medios sólidos empleados para el aislamiento de las bacterias marinas fueron medios con alta concentración de nutrientes adecuados para bacterias copiotrofas como el agar de triptona y soja con 1% de NaCl (TSA-I, Panreac) y agar marino (AM, Panreac). Se utilizaron también medios con baja concentración de nutrientes como el agar marino diluido (AM 1/100), y agua de mar filtrada y autoclavada (FAS) suplementada con 0,5 g/L de los polímeros agarosa, quitina y almidón (FAS-POL) (Romero et al., 2011). Se realizaron diluciones seriadas de orden 10 de las muestras en agua de mar autoclavada (1/10, 1/100, 1/1000) y se sembraron en placa con los medios de cultivo anteriormente citados para realizar el recuento bacteriano. Las placas se incubaron a 22°C durante 15 días. Para la estima de la densidad bacteriana se seleccionaron las placas que contenían entre 30-300 colonias. Se aislaron un total de 155 colonias para el posterior cribado de actividad QQ. Puesto que todas las cepas obtenidas fueron capaces de crecer en AM a 22°C, se seleccionaron estas condiciones como método de cultivo estándar para su manipulación en el laboratorio.

2.2 Muestras de saliva y placa dental

Para la detección de bacterias orales con sistemas de QS mediados por las señales tipo AHL se procedió al aislamiento de cepas procedentes de saliva y de placa dental de un paciente sano y otro periodontal. Los medios sólidos empleados para el aislamiento de las bacterias orales fueron agar sangre Columbia (Scharlau) y agar Schaedler con sangre y vitamina K1 (Scharlau) mientras que las muestras de placa dental se mantuvieron en medio tioglicolato hasta su siembra. Tanto para las muestras de saliva como para las de placa dental, se realizaron diluciones seriadas en medio tioglicolato en órdenes de 10 (1/10, 1/100, 1/1000) y se sembraron en placa con los medios de cultivo anteriormente citados para realizar el recuento bacteriano. Las placas se incubaron a 37°C en jarra de anaerobiosis GENBox (Biomerieux) durante 15 días. Para la estima de la densidad bacteriana se seleccionaron las placas que contenían entre 30-300 colonias. Se aislaron un total de 287 colonias de placa dental y 280 colonias de saliva para el posterior cribado de actividad QS.

Para comprobar la presencia de cepas distintas a *Streptococcus* en las biopelículas cultivadas *in vitro* en los medios BHI, Schaedler y McBain, antes de la secuenciación se llevó a cabo el aislamiento de bacterias cultivables de las diferentes biopelículas sobre agar Schaedler con sangre suplementado con vitamina K1 que se incubaron durante 7 días a 37°C en condiciones de anaerobiosis.

3. Recogida de muestras orales para análisis de AHLs

3.1 Protocolo de toma de muestras de individuos

Las muestras fueron recogidas por odontólogos profesionales en centros del Servicio Galego de Saúde (SERGAS). El diseño del estudio, así como los protocolos fueron examinados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galiza (Código de registro: 2009/319, y posterior modificación en 2017). Se obtuvo un consentimiento informado de todos los pacientes.

Se seleccionaron 12 individuos con caries y/o enfermedad periodontal para la búsqueda de AHLs en muestras de piezas dentales extraídas y las respectivas muestras de saliva. Ninguno de ellos estaba tomando antibióticos en el momento de la recogida de muestras. La edad de los pacientes es de entre 29 y 65 años. Las muestras de saliva obtenidas de un paciente sano y otros periodontal proceden de dos mujeres de entre 30 y 40 años, siendo el paciente periodontal fumador con tratamiento por enfermedad cardíaca.

3.2 Muestras para la identificación del perfil de AHLs

Se usaron dientes extraídos, saliva y placa dental de diferentes pacientes, como muestras para la extracción de moléculas tipo AHLs. Todos los pacientes firmaron un informe de consentimiento y los protocolos han sido autorizados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galiza (Código de registro: 2009/319, y posterior modificación en 2017). Tanto los dientes, como las muestras de placa dental se mantuvieron en PBS pH2 y se guardaron a 4° C hasta su extracción.

3.3 Muestras para la formación de biopelícula

La saliva utilizada para la formación de biopelículas *in vitro* fue recogida en un envase estéril, diluida 1:2 en PBS pH 6,5 o en glicerol estéril 60% según se fuera a utilizar inmediatamente o a almacenar a -80°C. Las muestras de placa dental se mantuvieron en PBS pH 6,5 hasta su uso.

4. Detección de moléculas tipo AHLs

4.1 Cribado mediante una bacteria biosensora

Se utilizaron las 605 cepas marinas y 567 cepas orales para realizar un cribado funcional y detectar si alguna de estas bacterias era capaz de activar al biosensora de AHLs *A. tumefaciens* NTL4 (Chilton et al., 1974; Shaw et al., 1997). Las cepas se inocularon en 200 µL de medio de cultivo, CM o Schaedler+K1, en placas microtiter de 96 pocillos se cultivaron durante 48 h a 22°C. Los cultivos se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a una nueva placa. Se midió el pH de los cultivos para asegurar que estuvieron por debajo de pH 8 y así evitar la lactonólisis de las AHLs por alcalinización del medio (Yates et al., 2002). A los sobrenadantes se les añadió una mezcla de 50 µL de medio AB blando (0,2% agar) con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopirósido (X-GAL, 80 µg/mL) y un pre-inóculo de *A. tumefaciens* NTL4 (1:5). Las

placas se incubaron durante 8 h a 30°C, para después observar a presencia/ausencia de un pigmento azul sobre la superficie de los pocillos. Como control se usó el medio de cultivo con la señal C6-HSL (10 µM).

Se probó la capacidad de las 12 cepas marinas con actividad QQ de amplio espectro de activar el biosensor *A. tumefaciens* NTL4. Para ello se realizó un ensayo de difusión sobre agar (modificado de Torres et al., 2013). Una mezcla 5:1 compuesta por el medio AB blando (0,8%) y X-GAL (80 µg/mL) se utilizó para cubrir la superficie de placas de AB. Después, se añadieron 10 µL de sobrenadantes de los cultivos de las bacterias marinas de 24 h y 48 h de incubación. Las placas se incubaron a 22°C durante 24 h. Como control se utilizó C6-HSL (10 µM).

5. Identificación del perfil de AHLs mediante HPLC-MS

Se comprobó, mediante HPLC-MS, si las cepas marinas y orales producían señales de QS tipo AHLs. Para ello las bacterias se cultivaron durante 48 horas. Se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos por centrifugación (10.000 rpm, 5 min), que fueron acidificados a pH 2 con HCl 1 M e incubados 24 horas a 25°C para permitir la recircularización del anillo lactona debido a la posible pérdida de las AHLs por la acción de la alcalinización del medio o por la presencia de una lactonasa. Los sobrenadantes acidificados se extrajeron dos veces con el mismo volumen de acetato de etilo y otras dos veces más con diclorometano (Parga, 2019). El solvente se evaporó bajo flujo de nitrógeno o rotavapor en función de la cantidad de muestra y el extracto se resuspendió en acetonitrilo para su posterior análisis y cuantificación por HPLC-MS. Como control se utilizó el medio de cultivo o el PBS, procesados y extraídos de la misma forma. El mismo protocolo se utilizó para la identificación del perfil de AHLs en muestras de saliva, placa dental y piezas dentales extraídas.

El análisis se llevó a cabo con un HPLC 1100 series (Agilent EEUU) equipado con una precolumna C8 (2,1x12,5 mm, 5 µm de tamaño de partícula) y una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 2,1 x 150 mm (con 5 µm de tamaño de partícula), mantenidas a 45°C. Se estableció una fase móvil con 0,1% de ácido fórmico en agua (A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). La tasa de flujo fue de 0,22 mL/min. Las condiciones de elución: 0 min 35% de B, gradiente lineal hasta 60% de B durante 10 min, un gradiente lineal de 60 al 95% de B durante 5 min y luego 5 min a 95% de B y un minuto para volver a las condiciones iniciales que se mantuvieron durante 9 min. Alícuotas de 20 µL de cada muestra se diluyeron en acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico antes de su inyección en la columna. El espectrómetro de masas (MS) utilizado fue un API 4000 triplecuadrupolo (Applied Biosystem, CA, EEUU) equipado con una fuente TurboIon utilizada en modo electrospray de iones positivos y monitorización de múltiples reacciones (MRM). Las señales MRM se utilizaron para obtener información de cuantificación relativa por comparación con una curva de calibración construida por abundancia de iones moleculares obtenidos a partir de AHLs sintéticas estándar (Milton et al., 2001). Se utilizaron como estándares las AHLs con o sin sustituciones oxo- o hidroxil- y de tamaños de cadena lateral entre 4 y 18 carbonos. Las AHLs en las muestras fueron identificadas por comparación de tiempos de elución y espectros de picos obtenidos para las estándar (Romero et al., 2010; Mayer et al., 2018).

6. Actividad quorum quenching contra AHLs

Para detectar la capacidad de interferir con el sistema de QS mediado por AHL se realizó un bioensayo en el cual las 605 cepas marinas y 567 cepas orales se cultivaron en presencia de este tipo de señales y su degradación se detectó mediante el uso de bacterias bioindicadoras. El biosensor utilizado en este caso es la bacteria *C. violaceum* CV026 (McClellan et al., 1997) que es incapaz de producir su pigmento púrpura característico (violaceína) al tener mutado el gen productor de la señal C6-HSL, pero es capaz de responder a señales de tipo AHLs añadidas exógenamente. Cada aislado marino se inoculó con 200 μ L de caldo marino (CM) en cada uno de los pocillos de una placa microtiter de 96 pocillos y se cultivaron a 22°C durante 48 horas. Una vez crecidos los cultivos, las placas se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos, se retiró el sobrenadante y las biomásas resultantes se resuspendieron en 200 μ L de PBS pH 6,5 con la molécula señal C6-HSL (2 μ g/mL). Tras 24 horas de incubación, se sometió a los cultivos a 30 minutos de radiación ultravioleta para impedir su interferencia con el crecimiento del biosensor. Para detectar la presencia de AHLs en los pocillos se realizó una dilución 1/100 de un cultivo de 24 horas de *C. violaceum* CV026 en LB blando (0,2% agar) y se añadieron 50 μ L de esta mezcla a cada pocillo. Las placas así preparadas se incubaron 24 horas a 30°C para la posterior observación de la producción de violaceína (Figura 12).

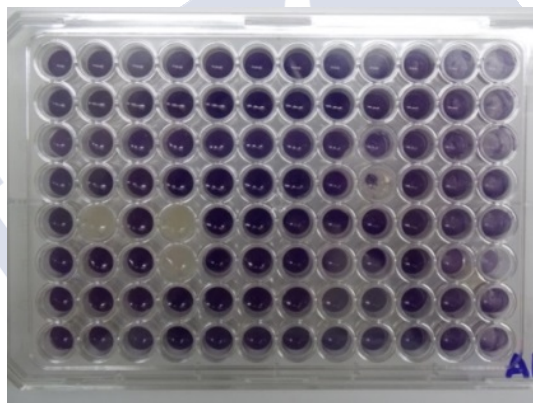


Figura 12. Imagen del bioensayo en placa microtiter de 96 pocillos para la detección de actividad QQ en cepas marinas con la cepa biosensora *C. violaceum* CV026. Las cepas capaces de interceptar la señal C6-HSL (2 μ g/mL) tras 24 horas impiden la activación de la producción de violaceína en el biosensor.

En el caso de las bacterias marinas, los resultados positivos obtenidos en este cribado de actividad QQ se comprobaron en bioensayo en medio sólido utilizando placas Petri. Este cribado nos permite descartar inhibición de crecimiento y diferenciar actividad enzimática de presencia de inhibidores. Cada cepa positiva se cultivó en un tubo eppendorf con 500 μ L de CM que se incubó durante 24 horas a 22°C. Pasado este tiempo, el cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en 500 μ L de PBS pH 6.5 con C6-HSL (2 μ g/mL). Para la detección de la interceptación de AHL, se tomaron 100 μ L de sobrenadante de los cultivos y se añadieron a pocillos practicados en placas de LB cubiertas con 5 mL de una dilución de 1/100 de un cultivo de 24 horas de *C. violaceum* CV026 en LB blando. Se utilizó como control PBS pH 6,5 suplementado con C6-HSL. Las placas así preparadas se incubaron 24 horas a 30°C para la posterior observación de la producción de violaceína. Para determinar la especificidad de la actividad QQ detectada en el cribado de las bacterias marinas y posteriormente confirmada en el bioensayo en medio sólido, se probó además la capacidad de

intercepción de las señales OC6, C12 y OC12-HSL por las cepas seleccionadas. Para ello se utilizó nuevamente en bioensayo en medio sólido citado anteriormente. Para la detección de las señales largas C12 y OC12-HSL se empleó la cepa biosensora *C. violaceum* VIR07 (Morohoshi et al., 2008a).

Se obtuvo el sobrenadante y el extracto celular purificado (PCE) de cultivos de 24 horas de las cepas con actividad QQ seleccionadas con el objetivo de determinar la localización de la actividad degradadora de las AHLs. Los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 9.000 rpm para separar la biomasa del medio de cultivo. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 μm y se almacenó a 4°C, hasta su uso. La biomasa se resuspendió en PBS pH 6.5, se sonicó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El PCE así obtenido (Figura 13) se filtró a través de un filtro de 0.22 μm y se almacenó a 4°C (Romero et al., 2014; Muras et al., 2018b). Con el sobrenadante, acidificado a pH 6 para prevenir falsos positivos (Yates et al., 2002), y el PCE de las cepas con actividad QQ seleccionadas se realizó un bioensayo en medio sólido con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07. Se incubaron 500 μL de sobrenadante o PCE durante 24 horas con C6-HSL o C12-HSL a 22°C y 200 rpm. Los controles se incubaron de la misma forma con 500 μL de PBS pH 6.5+AHL 10 μM .

A los PCE que presentaron actividad QQ se les cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Lowry (modificado de Lowry et al., 1951) y se determinó, mediante diluciones en PBS de los extractos celulares (1/10, 1/100, 1/1.000), la concentración mínima activa (CMA) de proteína de extracto necesaria para eliminar la actividad AHL en una suspensión 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 24 horas.

Con el objetivo de discernir si la actividad QQ observada en las cepas marinas es una molécula inhibitoria y no a una actividad enzimática, se realizaron extractos celulares de metanol (MCE, *methanol cell extract*) (Figura 13). Para ello, cultivos de 24 horas de las cepas seleccionadas se centrifugaron durante 10 minutos a 9.000 rpm para separar la biomasa del medio de cultivo. La biomasa se resuspendió en metanol, se sonicó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se evaporó en un baño de nitrógeno, se resuspendió en PBS pH 6.4 y se almacenó a 4°C (Muras et al., 2018b).

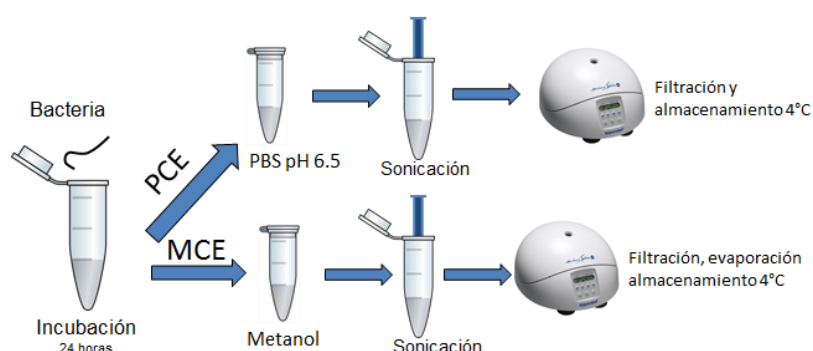


Figura 13. Metodología para la obtención de extractos celulares purificados (PCE, *purified cell extract*) y extractos celulares de metanol (MCE, *methanol cell extract*).

7. Actividad quorum quenching contra AI-2 y caracterización

Para la detección de la intercepción de la señal AI-2 se usaron las cepas *V. harveyi* BB170 (HAI-1 negativo; AI-2 positivo; CAI-1 positivo), *V. harveyi* JMH597 (HAI-1

negativo; AI-2 positivo; CAI-1 negativo) (Henke y Bassler, 2004) y *V. harveyi* JAF548, en el cual la producción de bioluminiscencia está desacoplada de los sistemas de QS (Freeman y Bassler, 1999; Defoirdt y Sorgeloos, 2012). Estas cepas biosensoras se inocularon en CM y se incubaron a 30°C durante 14-16 horas. Estos cultivos se diluyeron 1:5.000 en medio fresco BB. Los diferentes compuestos fueron añadidos a los pocillos donde estaban los cultivos de las cepas biosensoras en una proporción 1:10 en una placa negra microtiter (BRAND) e incubados a 30°C (modificado de Henke y Bassler, 2004). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Cada hora se tomó una fotografía usando el equipo Gel Doc™ XR+system Bio Rad con el objetivo de ver la producción de bioluminiscencia. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Con el objetivo de discernir si la actividad QQ contra AI-2 observada en la cepa *Tenacibaculum* sp. 20J es debida a una molécula inhibitoria y no a una enzima, se realizaron además diferentes tipos de extractos celulares (Muras et al., 2018b). La biomasa obtenida de un cultivo de *Tenacibaculum* sp. 20J de 50 mL se resuspendió en metanol, se sonicó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Una alícuota del sobrenadante se extrajo dos veces en un volumen igual de diclorometano (DM-MCE 20J) y el resto se evaporó en un baño a 40°C y se resuspendió en PBS pH 6.5 (MCE, *methanol cell extract*) y se almacenó a 4°C. Se usaron 500 µL del PCE para realizar una extracción orgánica con acetato de etilo (EA-PCE). Para determinar si la molécula responsable era de un pequeño o gran tamaño se utilizó una alícuota del PCE20J para el fraccionamiento molecular usando Centricon® Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Bedford, USA) de 100 kDa (YM-100), 50 kDa (YM-50) y 10 kDa (YM-10). Para evitar interferencias con la matriz del filtro, este se lavó con NaOH 0.1 N y agua desionizada. Además, una alícuota del PCE20J se ultracentrifugó (20 min, 300.000 g) y otra se dializó usando D-tube™ Dyalizer Mega (EMD Millipore Corp. Billerica, USA).

8. Purificación de la enzima Aii20J y comprobación de actividad

La enzima Aii20J se obtuvo de un trabajo anterior (Mayer et al., 2015) en el que la estrategia escogida para la purificación de dicha lactonasa se basó en la unión a una proteína de fusión. En este caso la cola de poli-histidina que proporciona el plásmido pET28c (+) para purificar mediante columnas de afinidad. Se preparó un cultivo de 50 mL de LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) de *E. coli* BL21 (DE3) plysS con el plásmido pET28c (+)-*aii20J* y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) entre 0,6-1. Se añadió IPTG a una concentración 1 mM para inducir la sobre-expresión de la proteína y se dejó incubar un mínimo de 5 horas más a 22°C en suave agitación. El cultivo se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min y el pellet obtenido se resuspendió en 20 mL de PBS pH 6,5. A continuación se añadió imizadol (2 M) y se sonicó la muestra durante media hora en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 9000 rpm y se recogió el sobrenadante para su posterior paso a través de la columna de afinidad por histidina *His GraviTrap™ affinity column* de GE Healthcare. Para eliminar el exceso de imidazol, tras su paso por la columna la muestra se dializó utilizando las membranas D-Tube™ Dialyzer Mega (MWCO 6-8 kDa) de Novagen® durante al menos 16 h.

Con el objetivo de comprobar que el efecto de Aii20J sobre las biopelículas orales se debe a la actividad lactonasa se decidió hacer un experimento de inhibición de biopelícula utilizando la enzima previamente autoclavada 15 minutos. Además, también se utilizó el sobrenadante obtenido tras filtrar la enzima Aii20J a través de un CENTRICON YM-10.

9. Estabilidad de la enzima Aii20J

La enzima Aii20J se añadió a dos enjuagues bucales suministrados por la empresa DENTAID: uno de color azul y otro de color rosa. Los colutorios con una concentración de 20 µg/mL de Aii20J se almacenaron a 22° y 40°C hasta uso. Para comprobar la estabilidad de la actividad lactonasa de Aii20J en los colutorios se realizaron bioensayos en medio sólido con el biosensor *C. violaceum* CV026 a diferentes tiempos (desde 1 día a 2 años). Se incubaron 500 µL de los enjuagues con Aii20J durante 3 horas o 24 horas en presencia de la señal C6-HSL a 22°C y 200 rpm y posteriormente se realizó el bioensayo en placa Petri como se comentó anteriormente.

10. Formación de biopelícula

10.1 Sistemas clásicos

Los cultivos de 24 horas de *S. mutans* en BHI (Panreac) suplementado con 0,1% sacarosa se ajustaron a una densidad óptica de 0,05 (600 nm) y se inocularon en placas microtiter de 24 o 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación en estático a 37°C, se eliminó el sobrenadante y los pocillos se lavaron con agua destilada. Después de dejar secar las biopelículas, se añadió cristal violeta 0,1% (Gram-Hucker, Panreac) a los pocillos y se incubó durante 20 minutos. El exceso de cristal violeta se eliminó lavando varias veces con agua destilada. Para solubilizar la biopelícula teñida con el cristal violeta se añadió ácido acético 33%. Se midió. Los resultados se obtuvieron al medir la absorbancia a 590 nm (Muras et al., 2018b).

También se realizó la observación microscópica de la biopelícula cariogénica formada por *S. mutans* en placas Petri de 35 mm que contenían 3 mL de BHI suplementado con 0,1% de sacarosa. Después de la incubación, se eliminó el sobrenadante, se lavaron las células para eliminar los restos de medio de cultivo y la biopelícula se tiñó con cristal violeta como se mencionó anteriormente o con Syto9 del BacLight Live/Dead Bacterial Viability Kit (ThermoFisher Scientific). Para las muestras teñidas con Syto9 se utilizó un microscopio de laser confocal Leica TSC SP2 (Leica Microsystem Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) con un objetivo HCX PL APO 63x/1.3 Gly y para la biopelícula teñida con cristal violeta se usó un microscopio Nikon Eclipse E400 con cámara Leica MC170 HD. Se evaluaron ocho campos seleccionadas al azar de cada muestra. Se escanearon las secciones ópticas de 1 µm en 1 µm desde la superficie de la biopelícula hasta su base, midiendo el grosor máximo del campo y calculando el espesor medio correspondiente a cada muestra. La cuantificación del porcentaje de superficie cubierta (µm²) se obtuvo mediante la comparación de la superficie total del campo con la superficie cubierta por la biopelícula bacteriana.

10.2 xCELLigence System RTCA ®

La cuantificación de la formación de biopelícula formada por *S. mutans* y las bacterias presentes en la saliva se realizó usando el equipo xCELLigence® System RTCA (ACEA, Biosciences Inc.) (Junka et al., 2010; Cihalova et al., 2015) el cual ha sido validado recientemente para la medición de formación de biopelículas de Gram-positivos (Ferrer et al., 2016, Gutiérrez et al., 2016). Dado que el xCELLigence® utiliza unos sensores microelectrónicos integrados en el fondo de unas placas especiales denominadas E-plates, este equipo solamente permite medir la biopelícula que se forma en el fondo del pocillo, no siendo capaz de detectar la que se forma en la interfase aire-líquido. La impedancia, que es la medida de la oposición a la varianza de la corriente electrónica en el tiempo a través de un elemento eléctrico medido entre electrodos, está influenciada por la

viabilidad celular, el número celular, la morfología celular y el grado de adhesión (Figura 14). El aumento en la adherencia celular sobre los electrodos causa un aumento en la impedancia que se expresa en una unidad propia del equipo llamada índice celular (CI, *cell index*). Las E-plates 16 o E-plates 96 (ACEA, Biosciences Inc.) se inocularon con 180 μl de un cultivo de 24 horas de la bacteria formadora de biopelícula ajustada a una densidad óptica de 0,05 a los que se añadieron 20 μl de compuesto. Además de los diferentes extractos también se probaron la furanona C30 (0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich) y la lactonasa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Mayer et al., 2015) como agentes anti-biopelícula. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Para la correcta formación de biopelícula oral en este equipo fue necesario realizar una optimización de la metodología. Para ello, se utilizaron diferentes medios de cultivo (BHI, BHI suplementado con sacarosa 0,1%, BHI-2 y saliva humana estéril) y se probaron diferentes tipos de inóculo (saliva, bacterias orales de una muestra de saliva, placa dental y muestra subgingival). Las E-plates 16 (ACEA, Biosciences Inc.) se inocularon con 100 μl de medio cultivo y 80 μl de los diferentes tipos de inóculo (saliva, bacterias orales de una muestra de saliva, placa dental y muestra subgingival) a los que se añadieron 20 μl de compuesto. Además, también se probó a cuantificar la biopelícula en aerobiosis y en anaerobiosis. Esta última condición se consiguió al añadir al pocillo una gota de parafina líquida estéril.

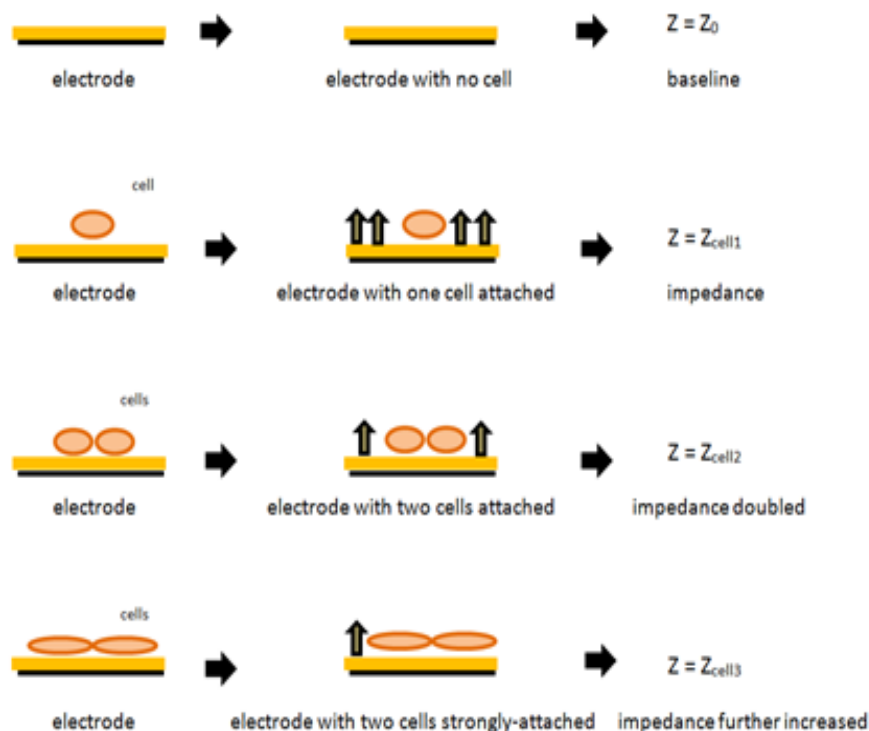


Figura 14. Esquema del funcionamiento del equipo xCELLigence® System RTCA (ACEA, Biosciences Inc.). Reproducido con permiso de la empresa.

10.3 Sistema de adhesión activa de Ámsterdam

El modelo de formación de biopelícula *Amsterdam Active Attachment model* (modelo AAA) se basa en tapas de acero que permiten la sujeción de 24 soportes donde se pueden colocar discos diferentes materiales como cristal o hidroxiapatita (Exterkate et al., 2010). La ventaja de este medio es que permite el cambio de medio sin alterar la formación de biopelícula. En este estudio se usaron discos de cristal de 12 mm de diámetro. Con este modelo se indujeron tres tipos de biopelículas distintas según el medio de cultivo utilizado (Janus et al., 2015): 1) biopelícula comensal: medio semidefinido tamponado McBain (McBain et al., 2005) que contiene 2,5 g/L mucina, 2 g/L Bacto peptona, 2 g/L tripticasa peptona, 1 g/L extracto de levadura, 0,35 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl₂, 1 mg/mL hemina, y 2 mg/L vitamina K1 con PIPES a pH 7.0; 2) biopelícula cariogénica: medio semidefinido tamponado McBain 0,2% sacarosa, y 3) biopelícula periodontal: medio semidefinido tamponado McBain con suero fetal bovino 10% (FCS, *fetal calf serum*).

La formación de la biopelícula cariogénica en el modelo AAA se inoculó en presencia de sacarosa y se incubó durante 48 h como se ha descrito en estudios previos (Janus et al., 2015). El modelo AAA se inoculó con saliva en proporción 1/100 en medio McBain con sacarosa al 0,2% y se incubó en anaerobiosis a 37°C durante 8 h para permitir la adherencia de los microbios a los discos de cristal. Después, la tapa con los discos se transfiere a una nueva placa con medio de cultivo fresco y se incubaba de nuevo por otras 16 h. Se siguió la misma rutina de renovación del medio de cultivo al día siguiente. Las biopelículas crecidas en McBain y en McBain con FCS se incubaron durante las primeras 8 h para permitir la adhesión y el resto de cambios de medio de cultivo se realizaron cada 24 h, con excepción de los fines de semana, recogiendo las biopelículas después de 9 días.

10.4 Modelo de adhesión activa

En el grupo de Acuicultura y Biotecnología de la USC (Aquabiotec) se ideó una modificación del modelo AAA (Figura 15) con el objetivo de obtener una mayor superficie de adherencia para los microorganismos (hasta 16,2 cm²).



Figura 15. Modificación del modelo AAA de Ámsterdam que permite la formación de biopelículas en 12 soportes. En la imagen se muestra el uso de cubres de cristal como superficie de adhesión que facilitan el cambio de medio de cultivo (A) y la gran cantidad de biopelícula formada usando esta metodología (B).

La modificación del modelo AAA se basa igualmente en tapas de acero, pero estas permiten una mayor superficie de adhesión a los microorganismos al usar cubres de cristal de 18x18 mm. Las biopelículas se inocularon con muestras de saliva da pacientes sanos y pacientes con patologías orales en una proporción 1/100 y el medio de cultivo se renovó

cada 12 h. Para la correcta formación de biopelícula oral en este equipo fue necesario realizar una optimización de los tiempos de incubación. Estos experimentos se hicieron utilizando BHI, BHI suplementado con sacarosa 0,1% y BHI-2 (Sánchez et al., 2011) en condiciones de aerobiosis y de anaerobiosis. Además, utilizando este modelo se caracterizó la población bacteriana de las biopelículas formadas *in vitro* a partir de una muestra de saliva de un paciente sano en tres medios de cultivo distintos: BHI, Schaedler con vitamina K1 y McBain.

11. Caracterización fenotípica de biopelículas orales

11.1 Cuantificación de unidades formadoras de colonias

Las biopelículas formadas en el modelo AAA se recogieron pasando los discos a un tubo con 2 mL de PBS, como se describió en trabajos anteriores (Janus et al., 2015). Las biopelículas se sonicaron con el objetivo de realizar la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (CFUs) y obtener el ADN para los análisis de secuenciación. El número de CFUs se determinó para estimar la formación de la biopelícula (Exterkate et al., 2010, Janus et al., 2015). Para ello, se hicieron diluciones seriadas de las biopelículas dispersadas en agua de cisteína y peptona (CPW, *cysteine peptone water*) y estas se plaquearon en agar de triptona soja con sangre (TSA-b, *tryptic soy agar blood*). Estas placas fueron incubadas anaeróbicamente durante 96 h a 37°C tras lo que se contó el número de CFUs.

11.2 Acumulación de ácido láctico

La producción de ácido láctico por las biopelículas cariogénicas, comensales y periodontales formadas en el modelo AAA se determinó antes de la recogida de las mismas con el objetivo de estimar su fenotipo cariogénico (Exterkate et al., 2010, Janus et al., 2015). Los discos fueron incubados en 1,5 mL de agua de peptona tamponada (BPW, *buffered peptone water*) con sacarosa al 0,2. Se permitió la formación de ácido durante 3 h bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C. La cantidad de lactato producida se cuantificó usando un método colorimétrico descrito previamente (van Loveren et al., 2000).

11.3 Actividad proteasa

Se usó el ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) para cuantificar la actividad proteasa de las biopelículas comensales y periodontales cultivadas en el modelo AAA. El medio de cultivo se filtró a través de 0,2 μm y se almacenó a -20°C hasta su uso. Los pocillos de una placa microtiter de 96 pocillos transparente se llenaron con 100 μL de tampón Tris salino (TBS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) y 100 μL del medio de cultivo. Cuatro μL de sustrato PEK-054 (800 μM) se añadieron a cada pocillo para obtener una concentración final de 16 μM . La fluorescencia se midió durante 2 h cada 5 minutos en un lector de placas con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm. Los valores de fluorescencia relativa (FR) se obtuvieron después de hacer la corrección con el medio de cultivo usado como control. La actividad proteasa está definida en RF por minuto (RF/min). La sonda usada PEK-054 (Cummings et al., 2002) es una sonda para la actividad de proteasa total.

11.4 Cuantificación de biomasa

Se comprobó el efecto de Aii20J sobre la formación de la biopelícula oral formada a partir de saliva de diferentes pacientes y se observó su estructura macroscópicamente en aquellas muestras cultivadas en el modelo AAA. Esto se realizó mediante la tinción con cristal violeta, como se describió anteriormente. La enzima se añadió al medio de cultivo tanto al principio de cada experimento como en los diferentes cambios de medio a una concentración final de 20 µg/mL.

12. Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano

Se probó el efecto de los extractos de *Tenacibaculum* sp. 20J y *T. maritimum* (100 µg/mL), Aii20J (20 µg/mL) y de la furanona (0,02 µg/mL) sobre el crecimiento planctónico de *S. mutans* midiendo su densidad óptica a 600 nm y comparándolo con cultivos control. Los cultivos se inocularon en placas microtiter de igual forma que en los experimentos para cuantificar la formación de biopelícula, a 37°C durante 24 horas. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Además, también se comprobó la posible actividad antimicrobiana haciendo un ensayo de difusión con discos dispuestos sobre la superficie de placas de BHI. Se usaron discos estériles de 6 mm de diámetro (Liofilchem®) para cargar 20 µl de los compuestos a testar sobre *S. mutans*. Después del periodo de incubación de 24 h a 37°C se comprobó la presencia de halos de inhibición en las placas.

13. Diversidad microbiana de bacterias cultivables marinas e identificación de aislados

Para conocer la diversidad de las bacterias cultivables asociada a las muestras de agua del mar Mediterráneo se realizó una extracción de ADN del conjunto de las bacterias en grupos de 65-80 cepas obtenida con el kit “DNeasy PowerSoil Kit” (Qiagen®). El análisis de las muestras (amplificación, secuenciación, limpieza e identificación taxonómica) fue realizado por la empresa Mr. DNA, Shallowater, USA. La amplificación del gen 16S ARNr se hizo mediante el ensayo de diversidad bTEFAP® (Lubbock, TX, USA). Las condiciones de PCR fueron: 94 °C durante 3 min seguidos por 28 ciclos a 94 °C durante 30 s, 53 °C durante 40 s, y 72 °C durante 1 min. La secuenciación (Miseq, Illumina) y el procesamiento de los datos fue realizado utilizando BLASTn contra las bases de datos RDPII y NCBI (MR DNA, Shallowater, USA).

La identificación de las cepas marinas con actividad QQ seleccionadas se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación parcial del gen 16S ARNr. Para la extracción del ADN genómico de las bacterias se utilizó el kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol” (Promega). La amplificación se realizó con los cebadores universales 96 bfm (5'-GAGTTTGATYHTGGCTCAG-3') y 1152 uR (5'-ACGGHTACCTTGTTACGACTT-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en condiciones estándar: 35 ciclos de desnaturalización 95°C durante 1 min, hibridación a 53°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 2 min. Precedido de 2 min desnaturalización a 96°C (Romero et al., 2011). Para la identificación de estas cepas se utilizó la base de datos EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/>) (Chun et al., 2007).

14. Análisis metagenómico de las muestras marinas

El 15 de octubre de 2015 se recogieron 8 muestras (Med-OCT2015-15 m, Med-OCT2015-30 m, Med-OCT2015-45 m, Med-OCT2015-60 m, Med-OCT2015-75 m, Med-OCT2015-90 m, Med-OCT2015-1000 m, y Med-OCT2015-2000 m) de agua del mar Mediterráneo (37.35361° N, 0.286194° W) a diferentes profundidades. Seis de ellas fueron recogidas en los primeros 100 m de profundidad, cada 15 m, utilizando un sistema CTD (Seabird). Las otras dos muestras fueron obtenidas a 1000 y a 2000 m utilizando una roseta CDT. El análisis metagenómico de estas muestras (limpieza, ensamblando, predicción y anotación de los genes) fue realizado por el grupo del profesor Rodríguez-Valera de la Universidad Miguel Hernández de Elche como se describe en estudios anteriores (Haro-Moreno et al., 2018).

Para la búsqueda de enzimas de QQ en estos metagenomas solamente se utilizaron secuencias de lactonasas y acilasas de AHLs con actividad demostrada. Los análisis de otros genes relacionados con sistemas de comunicación mediados por QS como sintasas de AHLs (*LuxI*, *AinS* y *HdtS*) y receptores de AHLs (*LuxR* y *AinR*) así como la sintasa responsable de la producción de la señal AI-2 (*luxS*), se realizaron alineando las lecturas metagenómicas con la base de datos NR usando DIAMOND (Buchfink et al., 2015) (opción blastx, top hit, $\geq 50\%$ identidad, $\geq 50\%$ longitud de alineamiento, $e\text{-value} < 10^{-5}$). La abundancia de estos genes se normalizó con el número de lectura de los genes *recA* + *radA* para cada metagenoma. No se tuvieron en cuenta aquellas lecturas que coincidieron con proteínas virales o de eucariotas. Para el análisis de la frecuencia relativa de los genes de QQ en la columna de agua, se aplicó la misma secuencia de búsqueda de genes relacionados con metabolismo general oxidativo (*dmdA*) y el metabolismo normal de bacterias marinas, como nitrógeno (*amoC*, *amt*), fosfato (*pstA*), y azufre (*dsrA*, *soxB*) (Romero et al., 2012b; Ganesh et al., 2014).

15. Análisis de genomas y metagenomas orales

El análisis bioinformático de estos datos fue realizado por el grupo del profesor Alex Mira de FISABIO utilizando un total de 700 genomas orales y 137 metagenomas orales (10 de FISABIO y 127 procedentes del HMP). Los del HMP pertenecen mayoritariamente a muestras de placa dental supragingival, pero algunos se han obtenidos a partir de muestras de mucosa y otras partes de la boca. En cambio, los metagenomas de FISABIO se obtuvieron a partir de muestras de placa dental y 2 a partir de lesiones cariogénicas. Para la búsqueda de las secuencias de QS y QQ se han considerado aquellos resultados con $e\text{-value} < 10^{-5}$, longitud de alineamiento $> 50\%$ y similitud de la secuencia $> 50\%$.

Para la búsqueda de enzimas de QQ en genomas y metagenomas orales solamente se utilizaron secuencias de lactonasas, acilasas y paraxonasas de AHLs con actividad demostrada. Los análisis de otros genes relacionados con sistemas de comunicación mediados por QS como sintasas de AHLs (*LuxI*, *AinS* y *HdtS*) y receptores de AHLs (*LuxR* y *AinR*) así como la sintasa responsable de la producción de la señal AI-2 (*luxS*). La abundancia de estos genes se normalizó con el número de proteínas totales para cada metagenoma.

16. Análisis de la composición bacteriana de las biopelículas cultivadas in vitro

16.1 Efecto de la adición de AHLs en la composición de la población

El análisis metagenómico de estas muestras (purificación, amplificación, secuenciación, ensamblando, limpieza y asignación taxonómica) fue realizado en colaboración por el grupo del profesor Bastiaan Krom del *Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam* (ACTA, Ámsterdam, Países Bajos). Para el análisis del microbioma se seleccionaron las biopelículas comensales y periodontales a las cuales se les había añadido durante el cultivo las señales de QS C6, OC6, C8, OC8, C18 y OC18-HSL, así como sus controles respectivos. El ADN total se aisló y purificó como se describió en un trabajo previo (Janus et al., 2015). La concentración de ADN bacteriano se determinó por qPCR, usando una sonda-cebador con afinidad con el gen 16S ARNr (Ciric et al., 2010). Después de usó 1 ng de ADN para amplificar la región V4 hipervariable del gen 16S ARNr como se describió anteriormente (O'Donnell et al., 2015) con la modificación de realizar 33 ciclos de amplificación. Los amplicones se mezclaron de forma equimolar y se purificaron en gel de agarosa (Illustra[™], GE Healthcare, UK). Las lecturas emparejadas de 251 nucleótidos se generaron usando la plataforma Illumina MiSeq y el kit Illumina MiSeq Reagent v3 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) en the VUmc Cancer Center Amsterdam (Amsterdam, Países Bajos). Los datos se procesaron como se describió previamente (Koopman et al., 2016). La tabla con las OTUs se redujo aleatoriamente a 11.000 lecturas por muestra en Rv3.5.1 (R Core Team, 2018) usando los paquetes de R microbiome v1.4.0 (Lahti et al. 2017), phyloseq v1.26.0 (McMurdie y Holmes, 2013) y vegan v2.5-3 (Oksanen et al., 2018). La tabla de OTUs se transformó a log2 para ordenar los datos por análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*). Los puntos fueron generados con ggplot2 v.3.1.0 (Wickham, 2016).

16.2 Efecto de la adición de Aii20J en la composición bacteriana

Para observar el efecto del compuesto con actividad QQ en el microbioma se analizaron biopelículas cultivadas en aerobiosis (24 h) en BHI y BHI suplementado con sacarosa 0,1% obtenidas y en anaerobiosis en BHI (24 h o 48 h) a partir de muestras de saliva de un paciente sano y un paciente periodontal a las cuales se les había añadido la lactonasa Aii20J (20 µg/mL) en el medio de cultivo. El ADN total se aisló y purificó con el kit "DNeasy PowerBiofilm Kit" (Qiagen[®]). El análisis metagenómico de estas muestras y sus controles respectivos (amplificación, secuenciación, ensamblando, limpieza y asignación taxonómica) fue realizado por la empresa AllGeneetics (A Coruña, España). La librería se preparó usando 2,5 µL de ADN para amplificar un fragmento del 16S ARNr de 450 pb utilizando los primers Bakt_341F y Bakt_805R (Herlemann et al., 2011). La purificación de las librerías se llevó a cabo utilizando las cuentas magnéticas Mag-Bind RXNPure Plus (Omega Biotek), siguiendo las instrucciones del proveedor. La secuenciación se realizó en MiSeq PE300 (Illumina). Los datos se procesaron y analizaron con FLASH (Magoc y Salzberg, 2011), CUTADAPT software 1.3 (Martin, 2011), VSEARCH y UCHIME (Edgar et al., 2011). La asignación taxonómica se realizó con Qiime y el algoritmo UCLUST (Edgar, 2010) usando como base de datos SILVA (Quast et al., 2013).

Para observar el efecto del compuesto con actividad QQ en el microbioma se cultivaron biopelículas en los medios BHI, Schaedler y McBain en condiciones de aerobiosis (24 h) y anaerobiosis (48 h y 72 h) a las cuales se les había añadido la lactonasa

Aii20J (20 µg/mL) en el medio de cultivo. El ADN total se aisló y purificó con el kit “DNeasy PowerBiofilm Kit” (Qiagen®). El análisis metagenómico de estas muestras y sus controles respectivos (amplificación, secuenciación, ensamblado, limpieza y asignación taxonómica) fue realizado por el servicio de secuenciación masiva y bioinformática de FISABIO (Valencia, España). Se usaron 5 ng/µL de ADN para amplificar las regiones V3 y V4 hipervariables del gen 16S ARNr. Las lecturas emparejadas de 300 nucleótidos se generaron usando la plataforma Illumina MiSeq y el kit Illumina MiSeq Reagent v3 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Los datos se procesaron y analizaron con prinseq-lite (Schmieder y Edwards, 2011), qiime2 (Caporaso et al., 2010) y DADA2 (Callahan et al., 2016). La asignación taxonómica se realizó con el clasificador Bayesiano integrado en qiim2 usando como base de datos SILVA_release_132 (Quast et al., 2013). Los diferentes análisis se realizaron en el lenguaje R Rstatistics (R Core Team, 2012) usando diferentes paquetes: knir, knitcitations, markdown (Allaire et al., 2014; Xie, 2014; Boettiger, 2015), Biostringr y Vegan (Oksanen et al., 2017).

El análisis de los componentes principales (PCA, *principal component analysis*), en el que los datos se describen con nuevas variables no relacionadas llamadas componentes que se ordenan por la cantidad de varianza que describen, se realizó con R Rstatistics (R Core Team, 2012), generando las gráficas con ggfortify y ggplot2 (Wickham, 2016).

17. Análisis estadístico

17.1 Muestras marinas

Para la diversidad microbiana de las muestras marinas en la que se revelaron bacterias con actividad QQ, se analizó el efecto de la profundidad y el medio de cultivo en el número de CFUs/mL mediante el test no paramétrico Mann-Whitney utilizando el programa IBM SPSS statistics V20, considerando significativos aquellos datos con valor $p < 0,05$.

17.2 Muestras de biopelícula de *S. mutans*

Se realizó un análisis estadístico tipo t-student para determinar el significado estadístico de las diferencias de índice celular (CI) y crecimiento bacteriano de *S. mutans* entre los pocillos control y los pocillos tratados utilizando el programa IBM SPSS Statistics V20, considerando significativos aquellos datos con valor $p < 0,05$.

17.3 Muestras efecto adición de AHLs exógenas

El efecto de la adición de las diferentes AHLs sobre la formación de biopelícula (CFUs), producción de ácido láctico y actividad proteasa se comparó con el grupo control mediante el Welch's t-test, considerando significativos aquellos datos con valor $p < 0,05$. Se realizó un análisis permutacional multivariante de la varianza (PERMANOVA) usando la distancia de Bray-Curtis sobre la tabla de OTUs transformada (9999 permutaciones) en R. Las diferencias en los índices de diversidad de Shannon y en las abundancias de los OTUs fueron realizados en R utilizando el test Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis.

17.4 Muestras efecto de Aii20J sobre biopelícula oral

El efecto de la adición de la lactonasa Aii20J sobre la formación de diferentes tipos de biopelículas cultivadas en distintas condiciones se comparó con su grupo control correspondiente mediante el test t de Student utilizando el programa IBM SPSS Statistics V20, considerando significativos aquellos datos con valor $p < 0,05$.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO 1: PREVALENCIA DEL *QUORUM SENSING* EN EL MAR MEDITERRÁNEO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD *QUORUM QUENCHING*

Antecedentes

La comunicación química bacteriana está basada en la producción y detección de pequeñas moléculas autoinducidas que se acumulan en el ambiente y le permiten saber a la población cuando esta alcanza una determinada densidad de celular (Fuqua et al., 1994). En bacterias Gram-negativas esta comunicación intercelular está típicamente mediada por unas señales llamadas N-acil-homoserin lactonas (AHLs), que están formadas por un anillo lactona (HSL) unido por un enlace amida a una cadena de ácido graso de entre 4 a 20 carbonos. El sistema típico de QS basado en AHLs presenta una sintasa tipo LuxI y un receptor tipo LuxR (Ng y Bassler, 2009) pero también se han descrito otras familias de sintasas conocidas como LuxM/AinS y HdtS, que no presentan homología con la familia de la sintasa LuxI (Gilson et al., 1995; Laue et al., 2000).

A pesar de la baja población bacteriana en el mar, así como la baja estabilidad de las AHLs a pH altos en este medio, en los últimos años se ha empezado a comprender la importancia de los mecanismos de comunicación bacteriana mediados por las AHLs en el medio marino (Cicirelli et al., 2008; Hmelo, 2017). Se han podido aislar multitud de bacterias productoras de este tipo de moléculas de QS a partir de numerosos microhábitats marinos: biopelículas submareales (Huang et al., 2008), esponjas, (Taylor et al., 2004; Mohamed et al., 2008), cnidarios (Tait et al., 2010; Ransome et al., 2014), y nieve marina (Gram et al. 2002; Hmelo et al., 2011; Jatt et al., 2015;). La presencia de AHLs en ambientes marinos abiertos también se ha demostrado por técnicas directas no dependientes de métodos de cultivo (Decho et al., 2009; Hmelo et al., 2011), encontrándose una gran diversidad de sintasas de AHLs en la base de datos metagenómicos “Global Ocean Sampling (GOS)” (Doberva et al., 2015). Esto sugiere que la producción de este tipo de moléculas está ampliamente distribuida en ambientes marinos.

En la actualidad, está comúnmente aceptado que los sistemas mediados por AHLs juegan un papel importante en varios procesos ecológicos marinos relevantes, entre los que se incluyen el asentamiento tanto de larvas de invertebrados (Joint et al., 2002; Tait et al., 2005) como de zoosporas de microalgas (Goecke et al., 2012). Se ha propuesto también que las AHLs producidas por las bacterias asociadas a la cianobacteria *Trichodesmium* sp. intervienen y coordinan la adquisición y el procesamiento del fósforo (Van Mooy et al., 2012), un nutriente limitante en los ambientes oceánicos oligotrofos. Además, se ha

sugerido que las AHLs participan en el ciclo del carbono al aumentar la actividad de ciertas enzimas hidrolíticas clave que degradan el carbono orgánico particulado (POC) presente en el agua de mar, desempeñando un papel importante en la remineralización en profundidad del mismo (Ziervogel y Arnosti, 2008; Hmelo et al., 2011). Se cree que los procesos mediados por QS tienen incluso un papel ecológico más relevante en microhábitats marinos específicos, en los cuales la población bacteriana está más concentrada, formando en ocasiones agregados celulares (Cicirelli et al., 2008; Hmelo, 2017). Las distintas relaciones tanto simbióticas como patogénicas que se establecen con los hospedadores eucariotas también son ejemplo de la importancia de estos nichos ecológicos (Goecke et al., 2012; Wahl et al., 2012) pues la expresión de genes de virulencia en bacterias marinas patógenas de peces está a menudo controlada a través de sistemas mediados por AHLs (Defoirdt et al., 2007).

Dado que los sistemas de QS tienen importantes efectos en las interacciones entre procariontas y también con eucariotas, tiene sentido que los competidores hayan desarrollado mecanismos para silenciar los sistemas de QS de otros grupos bacterianos. La habilidad para interferir con la comunicación bacteriana es una estrategia muy común usada por diferentes tipos de organismos: algas marinas (Givskov et al., 1996), plantas terrestres (Gao et al., 2003), células de mamíferos (Camps et al., 2011) y bacterias (Dong et al., 2001, 2005; Romero et al., 2015). El uso de enzimas con actividad QQ de origen bacteriano para interferir con las señales de QS la estrategia más común (Dong et al., 2001). Los genes que codifican para estas enzimas se clasifican mayoritariamente en dos grandes grupos: lactonasas y acilasas, aunque hay otros tipos de enzimas descritas (Grandclément et al., 2015; Romero et al., 2015). Se han aislado bacterias marinas con actividad QQ a partir de corales (Tait et al., 2010; Golberg et al., 2013), esponjas (Saurav et al., 2016), biopelículas marinas (Romero et al., 2011), agua de mar superficial y agua de estuario (Romero et al., 2012b; Linthorne et al., 2014), así como en criaderos de peces y bivalvos (Torres et al., 2013, 2016). Así, estudios previos han revelado una mayor presencia de enzimas de QQ en bacterias marinas (2-46%) en comparación con muestras terrestres (2-4,8%) (Dong et al., 2000, 2002; D'Angelo-Picard et al., 2005). La importancia del QQ en ambientes marinos también se apoya en datos de estudios metagenómicos, donde se ha observado una alta frecuencia de este tipo de genes en diferentes metagenomas marinos (Romero et al., 2012b). A pesar de que la relevancia del QS y del QQ en los nichos marinos parece ser clara, no existe ningún estudio en el que se combine el análisis metagenómico con la identificación de actividad QS y QQ en aislados cultivables en la misma muestra. Esta doble aproximación nos permite evitar las desventajas de ambos métodos. Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo es el estudio de la producción y degradación de AHLs en bacterias planctónicas del mar Mediterráneo en muestras de agua de mar obtenidas a 90 y a 2000 m de profundidad usando dos métodos diferentes pero complementarios, como son el cribado funcional de bacterias y el análisis metagenómico, para poder mejorar el conocimiento del importante papel de los procesos mediados por AHL en el medio marino. Además, la realización de cribado funcional con las bacterias capaces de crecer en medios de cultivo en condiciones estándar permitirá la identificación de nuevas cepas marinas candidatas para la clonación de enzimas y su aplicación biotecnológica (Mayer et al., 2015, 2018). Los resultados del presente capítulo han sido parcialmente publicados (Muras et al., 2018a, Anexo). Las figuras han sido reproducidas con permiso de la editorial.

Resultados

1. Aislamiento y crecimiento bacteriano

El aislamiento de las bacterias marinas se realizó a partir de muestras de agua de mar del Mediterráneo obtenidas a 90 y a 2000 m de profundidad en diferentes medios de cultivo (TSA-I, AM, Am 1/100 y FAS-POL). El número de UFCs/mL obtenido en la muestra de 2000 m de profundidad ($0,8-5,8 \times 10^3$ UFCs/mL) fue significativamente mayor que el obtenido en la muestra de 90 m ($0,2-0,6 \times 10^3$ UFC/mL) en todos los medios de cultivo empleados (Figura 16, Mann Whitney Test, $p < 0,05$), a pesar que no se utilizaron condiciones específicas para el aislamiento de cepas barófilas o psicrófilas en la muestra de mayor profundidad. El medio de cultivo no mostró efecto en las UFCs/mL obtenidas en la muestra fótica (Figura 16, Mann Whitney Test, $p > 0,05$). En cambio, los medios AM y FAS-POL presentaron tres veces más UFCs que los otros medios en la muestra de 2000 m (Figura 16, Mann Whitney Test, $p < 0,05$). Esto es consistente con el aumento observado de los nutrientes, tanto orgánicos como inorgánicos, con la profundidad y con el carácter estrictamente marino de las bacterias presentes a esta profundidad.

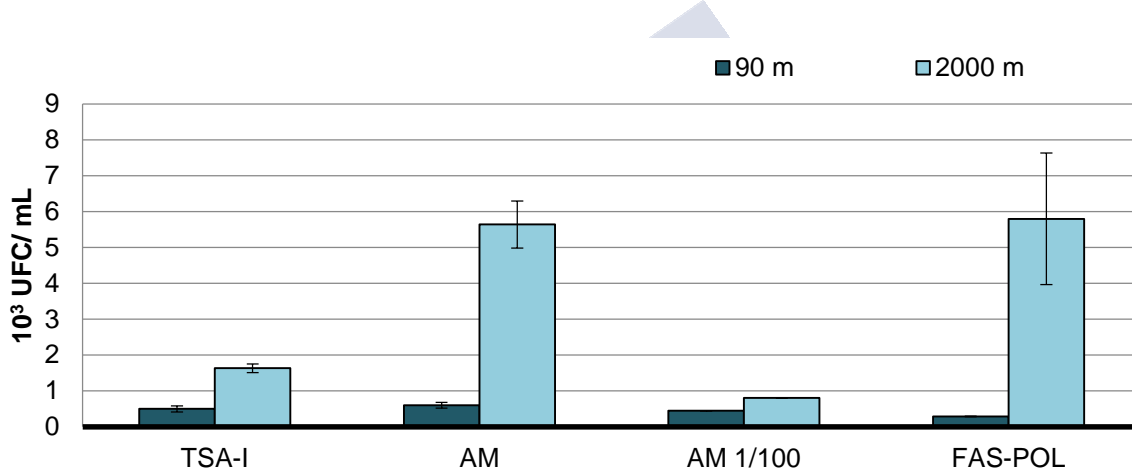


Figura 16. Concentración de bacterias cultivables (UFCs/mL) obtenidas de las muestras de la zona fótica (90 m) y de la zona afótica (2000 m) en los medios de cultivo Tripticasa Soja Agar 1% NaCl (TSA-I), Agar Marino (AM), Agar Marino diluido 1:100 (AM 1/100) y agua de mar filtrada y autoclavada enriquecida con polímeros (FAS-POL) (n=5). Figura de Muras et al., 2018a con permiso de MDPI.

2. Diversidad taxonómica de las cepas cultivables

Se probaron un total de 605 cepas, 231 de 90 m y 374 de 2000 m, para realizar tanto el cribado de detección de producción AHLs, así como los cribados para identificación de cepas marinas capaces de interferir con las señales C6 y/o C12-HSL (Tabla 4).

La diversidad de las bacterias cultivables fue muy similar entre las muestras de ambas profundidades (Figura 17). El análisis mediante técnicas de secuenciación metagenómica de la composición bacteriana mostró que los aislados pertenecían mayoritariamente a Gammaproteobacteria (34,88%), Firmicutes (30,95%) y Alphaproteobacteria (17,44%). Menos representados estaban los miembros de Actinobacteria (6,84%) y Bacteroidetes (7,14%). En ambas muestras los Firmicutes están altamente presentes (30%), a pesar de los datos obtenidos del análisis de los metagenomas (<1%) (Haro-Moreno et al., 2018). Las Gammaproteobacterias también están sobre-representadas en la muestra de 90 m (35%) en comparación con los datos del análisis del metagenoma (13,56%).

Tabla 4. Aislados obtenidos de diferentes muestras y utilizando distintos medios de cultivo. Se muestra el número total y el porcentaje de las cepas con actividad QS y QQ contra las señales C6 y C12-HSL usando el ensayo en medio sólido con bacterias biosensoras. Medios usados: tripticasa soja agar 1% NaCl (TSA-I), agar marino (AM), agar marino diluido (AM 1/100) y agua de mar filtrada autoclavada (*filtered autoclaved seawater*, FAS) suplementada con 0,5 g/L de polímeros: agarosa, quitina y almidón (FAS-POL). Tabla de Muras et al., 2018a con permiso de MDPI.

		N° Aislados	Cepas QS	%QS	Cepas QQ		%QQ	
					C6-HSL	C12-HSL	C6-HSL	C12-HSL
90 m	TSA-I	42	2	4,76	1	22	2,38	52,38
	AM	16	5	31,25	0	8	0	50,00
	AM 1/100	80	48	60,00	0	23	0	28,75
	FAS-POL	93	32	34,40	3	15	3,22	16,12
	Total	231	87	37,66	4	68	1,73	29,43
2000 m	TSA-I	119	3	2,52	1	35	0,84	29,41
	AM	155	0	0	0	67	0	43,22
	AM 1/100	71	9	12,67	7	60	9,85	84,50
	FAS-POL	29	3	10,34	0	14	0	48,27
	Total	374	15	4,01	8	176	2,12	47,05

La abundancia relativa a nivel de familia también mostró perfiles similares en ambas profundidades, con excepción de las familias *Vibrionaceae* y *Rhodobacterales* que solamente fueron identificadas en la muestra de 2000 m (Figura 17). Sin embargo, a nivel de género sí que se observaron diferencias en cuanto a la diversidad ya que se identificaron 56 y 82 géneros diferentes en las muestras de 90 y 2000 m respectivamente. A pesar de esto, las dos colecciones de bacterias cultivables comparten 11 de los 13 géneros más abundantes (Figura 17). Sorprendentemente, *Bacillus* fue el grupo más abundante en ambas muestras con una representación del 15,74% y 16,6%, en 90 m y 2000 m respectivamente. Los géneros *Microbacterium* y *Sphingomonas* solamente fueron identificados en la muestra de 90 m, mientras que los géneros *Pantoea* y *Vibrio* solo aparecieron a 2000 m (Figura 17). Más del 35% de la diversidad está compuesta por otros géneros representados por una única cepa.

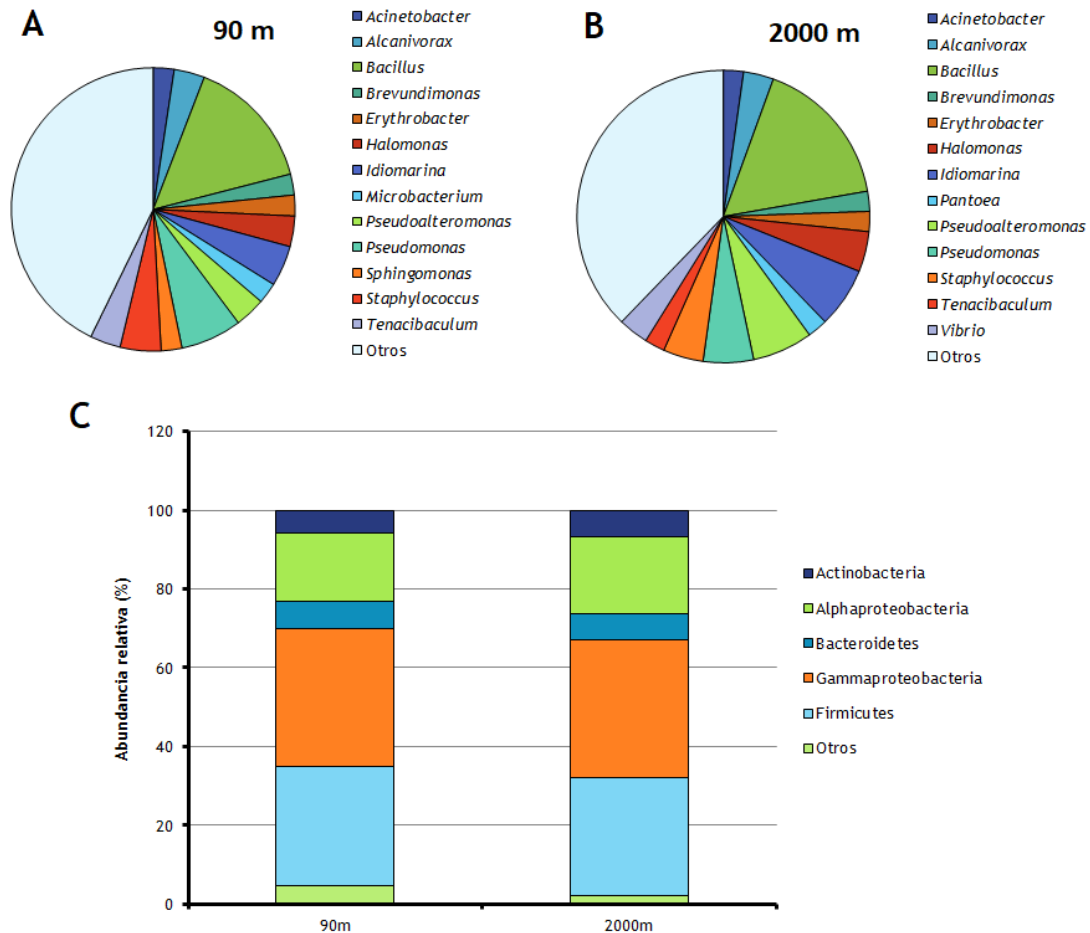


Figura 17. A) Diversidad de las bacterias cultivables aisladas la muestra de 90 m (n=231); B) diversidad de las bacterias cultivables aisladas la muestra de 2000 m (n=374); C) Abundancia relativa de los 13 géneros más abundantes en las muestras de 90 y 2000 m. Modificado de Muras et al., 2018a con permiso de MDPI.

3. Quorum sensing y quorum quenching en bacterias marinas cultivables

Para determinar la abundancia de los sistemas de QS mediados por AHLs dentro de las bacterias cultivables, se realizó un cribado funcional con los 605 aislados marinos en el que se utilizaron placas microtiter de 96 pocillos con la bacteria biosensora de AHLs *A. tumefaciens* NTL4. La activación del gen de la beta-galactosidasa de esta bacteria, que presenta un amplio espectro de respuesta a AHLs, sugiere la presencia de este tipo de señales en el medio de cultivo. Se observó que la capacidad de estas cepas marinas de activar dicha bacteria biosensora fue relativamente frecuente (102 cepas, 20,84%). El número de positivos fue mayor a 90 m (37,66%) que a 2000 m (4,01%) (Tabla 4, Figura 18). El medio de cultivo oligotrófico AM 1/100 permitió el aislamiento del mayor número de cepas con una supuesta actividad QS, tanto a 90 m (60%) como a 2000 m (12,67%). Por el contrario, las cepas aisladas utilizando el medio de cultivo TSA-I presentaron la menor frecuencia para activar la bacteria biosensora *A. tumefaciens* NTL4, 4,76% y 2,52% para 90 y 2000 m respectivamente.

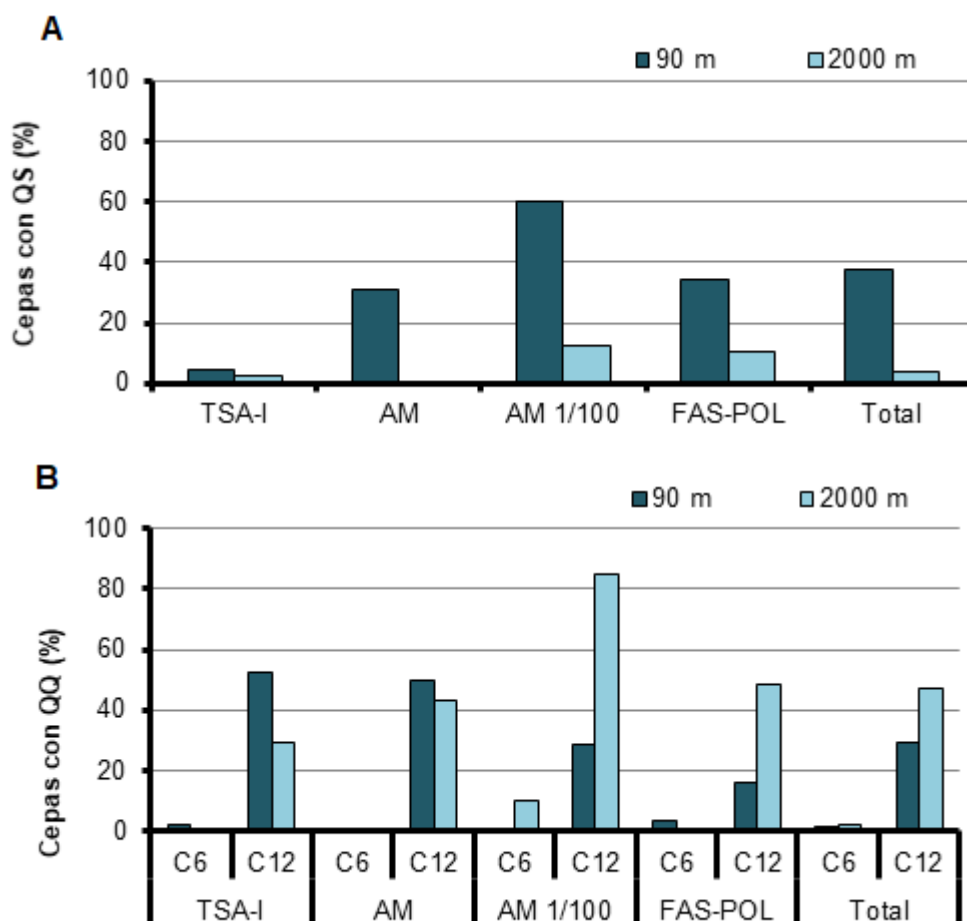


Figura 18. Actividad QS y QQ en bacterias cultivables aisladas de en distintos medios de cultivos A) Porcentaje de las cepas marinas aisladas capaces de activar el biosensor de AHL *A. tumefaciens* NTL4 a 90 m y 2000 m; B) Porcentaje de los aislados con actividad QQ contra las señales de C6 y C12-HSL para cada medio de cultivo a 90 m y 2000 m, confirmado usando el ensayo en medio sólido en placa Petri con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07. Medios de cultivo utilizados: Tripticasa Soja Agar 1% NaCl (TSA-I), Agar Marino (AM), Agar Marino diluido 1:100 en agua de mar (AM 1/100) y agua de mar filtrada y autoclavada enriquecida con polímeros (FAS-POL). Figura de Muras et al., 2018a con permiso de MDPI.

La capacidad de las bacterias marinas para interferir con señales AHL de cadena corta (C6-HSL) y/o cadena larga (C12-HSL) se probó inicialmente con el biosensayo en microtiter de 96 pocillos con *C. violaceum* (Mayer et al., 2015). Aquellas cepas positivas en el cribado preliminar se re-aislaron y su actividad QQ fue confirmada usando el ensayo en medio sólido en placa Petri. Ninguna de las cepas seleccionadas mostró interferencia con el crecimiento del biosensor. La habilidad para interferir con la señal de QS C12-HSL se observó en un gran número de bacterias cultivables (242 cepas, 38,24%). Esta actividad fue mayor en la muestra afótica de 2000 (47,05%) que en la muestra fótica de 90 m (29,43%, Figura 18). Entre las 68 cepas aisladas de 90 m de profundidad con capacidad para interferir C12-HSL, cuatro de ellas (1,73%), mostraron también actividad QQ contra C6-HSL. Este dato fue similar al obtenido para los aislados procedentes de la muestra de 2000 m (2,12%). Todos los aislados activos contra C6-HSL pudieron también degradar C12-HSL, pero no hubo ninguna cepa con la capacidad de eliminar solamente AHLs de cadena corta. El medio de cultivo oligotrófico AM 1/100 permitió el aislamiento del mayor porcentaje de cepas con actividad QQ contra C12-HSL (84,5%) en la muestra de 2000 m de profundidad. Por el contrario, en la muestra de 90 m los medios TSA-I y AM presentaron los valores más altos de actividad QQ (50-52%). El medio de cultivo más

eficaz para el aislamiento de cepas capaces de degradar la señal corta C6-HSL fueron los medios oligotróficos FAS-POL (3,22%) y AM 1/100 (9,25%) en las muestras de 90 y 2000 m, respectivamente.

4. Identificación de las cepas con actividad quorum quenching de alto espectro y caracterización de dicha actividad

Se seleccionaron las 12 cepas con actividad QQ de amplio espectro al presentar capacidad para interferir con ambas señales C6 y C12-HSL, para asignar su afiliación taxonómica (Tabla 5). Las cuatro cepas marinas seleccionadas de la muestra de 90 m pertenecen a Firmicutes (*Planomicrobium chinense*), Alphaproteobacteria (*Sphingopyxis alaskensis*, *Erythrobacter citreus*) y Actinobacteria (*Microbacterium schleiferi*). De entre las siete cepas seleccionadas de la mayor profundidad, seis pertenecen a Alphaproteobacteria (5 cepas de *Erythrobacter flavus*, *Citromicrobium* sp.) y una a Gammaproteobacteria (*Pantoea* sp.). Además, aunque inicialmente identificada como *Ralstonia* spp., al amplificarse una secuencia con primers de 16S ARNr que presentaba una homología de 95,79% pero la secuenciación del genoma confirmó que se corresponde con la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*.

Tabla 5. Identificación y caracterización de los aislados marinos que mostraron amplio espectro de actividad QQ. Se muestra la presencia de actividad QQ en los extractos celulares y la concentración mínima de extracto (CMA, µg proteína/mL extracto celular) necesaria para la completa inhibición de la actividad de 10 µM of C6-HSL. Modificado de Muras et al., 2018a con permiso de MDPI.

	Cepa	Cepa cultivada más cercana	% ID 16S	Célula viva				Extracto celular		CMA C6-HSL
				C6-HSL	OC6-HSL	C12-HSL	OC12-HSL	C6-HSL	C12-HSL	
90 m	1F1	<i>Planomicrobium chinense</i>	99,93	+	+	+	+	+	+	104,7
	2E12	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	99,93	+	+	+	+	+	+	18.67
	2G12	<i>Erythrobacter citreus</i>	99,04	+	+	+	+	+	+	1918
	3A3	<i>Microbacterium schleiferi</i>	99,71	+	+	+	+	-	+	nd
2000 m	2F1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	92,24	+	+	±	+	+	+	17,6
	3G7	<i>Erythrobacter flavus</i>	99,34	+	+	+	+	+	+	786
	4B4	<i>Erythrobacter flavus</i>	99,34	+	+	+	+	+	+	216
	4B7	<i>Pantoea</i> sp.	96,01	+	-	+	-	-	-	nd
	4B9	<i>Erythrobacter flavus</i>	99,71	+	+	+	+	+	+	961
	4B10	<i>Erythrobacter flavus</i>	99,49	+	+	+	+	+	+	223,9
	4B12	<i>Erythrobacter flavus</i>	99,49	+	+	+	+	+	+	965
	4C3	<i>Citromicrobium</i> sp.	98,33	+	+	+	+	-	+	nd

Únicamente tres de las cepas, *Microbacterium* sp. 3A3, *Pantoea* sp. 4B7 y *Citromicrobium* sp. 4C3 perdieron su actividad contra C6-HSL como extractos celulares. También se probó la capacidad de interferir con AHLs oxo-sustituidas (Tabla 2). La mayoría de los aislados fue capaz de interferir con estas señales, excepto la cepa 4B7 (*Pantoea* sp.) que no mostró actividad QQ contra OC6 y OC12-HSL. Con el objetivo de establecer la actividad QQ relativa de las cepas, se calculó la concentración mínima activa (CMA, μg proteína/mL). Las cepas con mayor actividad QQ fueron *Sphingopyxis* sp. 2E12 y *Rhodorotula* sp. 2F1, que presentaron una CMA al menos un orden de magnitud menor que las otras cepas con QQ ($< 20 \mu\text{g/mL}$).

Se comprobó la posible producción de AHLs por estas 12 cepas seleccionadas utilizando un ensayo de difusión en placas de agar con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4. Los sobrenadantes de *Sphingopyxis* sp. 2E12 y *Erythrobacter* sp. 2G12 obtenidos tras 24 horas de cultivo fueron capaces de activar el biosensor (no se muestran datos). En cambio, en los sobrenadantes de 48 horas esta actividad solo se mantuvo en *Sphingopyxis* sp. 2E12 y desapareció en *Erythrobacter* sp. 2G12. La cepa *Citromicrobium* sp. 4C3 fue capaz de activar el biosensor a las 48 horas de cultivo. Sin embargo, esta actividad no puede ser responsable de la actividad de QQ observada en estas cepas puesto que la actividad QQ también está presente en los extractos celulares y la concentración de la señal acumulada sería demasiado baja como para eliminar totalmente la actividad de la alta concentración de AHL usada en el cribado de actividad QQ. Ninguna de estas cepas fue capaz de inducir el biosensor en el ensayo utilizando la placa microtiter, lo que indica que las condiciones de cultivo son cruciales para detectar la producción de AHLs, indicando que el número de cepas productoras de AHLs puede estar subestimado.

5. Identificación y sobre-expresión de genes de *quorum quenching* de las bacterias cultivables aisladas

Con el objetivo de determinar las enzimas responsables de la actividad QQ identificada en las cepas bacterianas con mayor actividad, *Sphingopyxis* sp. 2E12 y *Erythrobacter* sp. 4B4, se realizó la secuenciación de sus respectivos genomas. Tras el análisis de las secuencias se hizo una búsqueda por comparación de homología con enzimas de QQ descritas previamente. Dado que se encontró una gran cantidad de secuencias putativas que podrían ser responsables de la actividad QQ, fue necesario establecer unos parámetros mínimos para poder seleccionar las secuencias candidatas con más probabilidades de presentar actividad. Estos criterios fueron presentar una cobertura mayor del 65% y una homología de al menos 25% con otras enzimas de QQ previamente descritas. Atendiendo a estos parámetros se seleccionaron una lactonasa y una acilasa de la cepa 2E12 mientras que se propusieron dos lactonasas y una acilasa para la cepa 4B4 (Tabla 6).

Tabla 6. Genes putativos seleccionados de las cepas 2E12 y 4B4. Se indica la homología con enzimas de QQ ya descritas, su cobertura, identidad y valor E.

Cepa	Gen	Tipo de enzima	Enzima QQ similar	Cobertura (%)	Identidad (%)	Valor E
2E12	SphiA	lactonasa	qsds <i>Sphingomonas ursincola</i>	91%	60%	8,00E-113
	SphiA2	acilasa	PvdQ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94%	27%	1,00E-49
4B4	EryF	lactonasa	Aii20L <i>Maribacter ulvicula</i>	89%	36%	1,00E-53
	EryF2	lactonasa	YtnP <i>Acinetobacter baumannii</i>	75%	29%	8,00E-21
	EryF3	acilasa	Aac <i>Ralstonia solanaceum</i>	68%	25%	1,00E-25

6. Genes de *quorum sensing* y *quorum quenching* en muestras metagenómicas

Se realizó la búsqueda de genes relacionados con el QS, sintasas de AHL (*LuxI*, *AinS* y *HdtS*) y receptores de AHL (*LuxR* y *AinR*), así como la sintasa responsable de la producción de AI-2 (*LuxS*) en los metagenomas de las muestras de cada profundidad. La abundancia relativa de los genes de QS parece reducirse ligeramente durante los primeros 100 metros (7,59-3,41, Figura 19A). Sin embargo, la abundancia relativa de los receptores de AHL fue alta en las dos zonas afóticas: 1000 m (9,02) y especialmente a 2000 m (20,52). Apenas se detectaron sintasas de AHL en el análisis de los metagenomas a lo largo de la columna de agua en comparación con la frecuencia de los receptores (Figura 19A). Sorprendentemente, no se identificaron secuencias homólogas de la sintasa *LuxS*, responsables de la producción de la señal AI-2, a pesar de la presencia de *Vibrio* en la muestra de bacterias cultivables (3,5%).

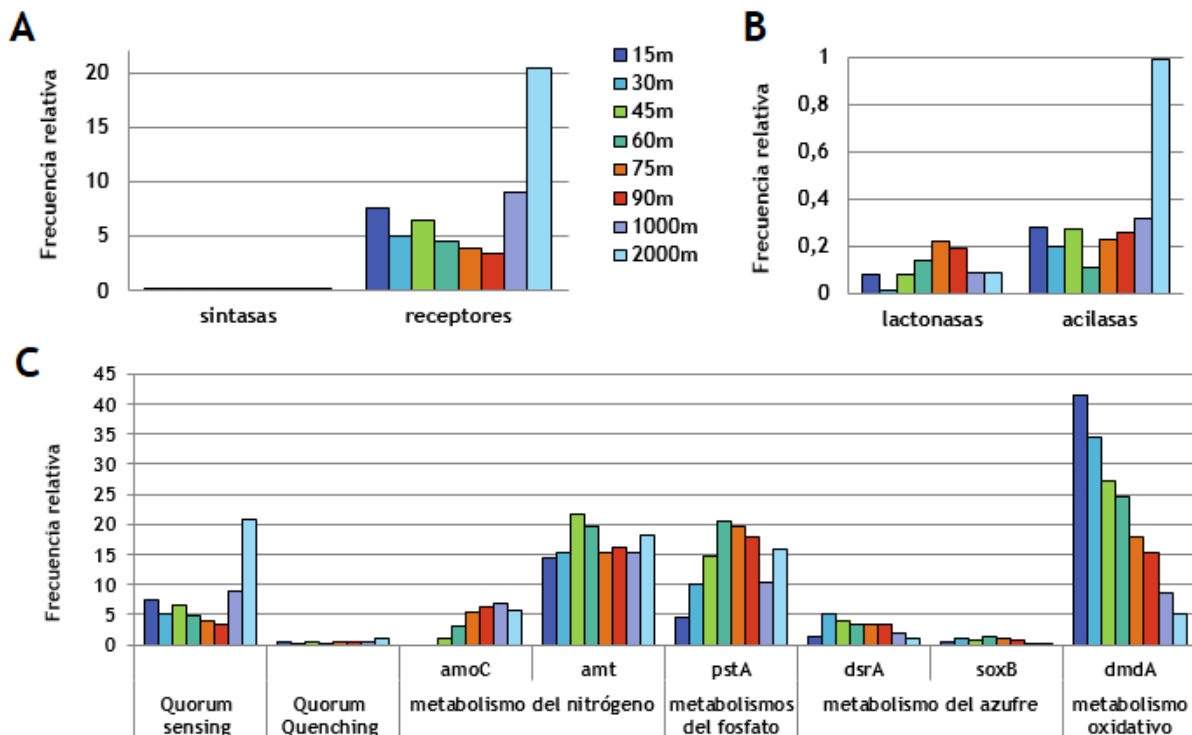


Figura 19. Relevancia de los genes de QS y QQ en los metagenomas de distintas profundidades del mar Mediterráneo. A) Frecuencia relativa de las sintasas y los receptores de AHL; B) Frecuencia relativa de los genes de QQ incluyendo lactonasas y acilasas; C) Frecuencia relativa de secuencias de QS y QQ en comparación con otros genes relacionados con la adquisición del nitrógeno (*amoC*, *amt*), fosfato (*pstA*) y azufre (*dsrA*, *soxB*) así como del metabolismo oxidativo (*dmdA*). Los datos fueron normalizados en función de la abundancia de los genes *housekeeping recA* y *radA*. Figura de Muras et al., 2018a con permiso de MDPI.

Utilizando los mismos metagenomas, se realizó también un análisis de la presencia de lactonasas y acilasas degradadoras de AHLs empleando únicamente secuencias de genes con actividad probada. De entre los genes de QQ, las acilasas fueron más frecuentes que las lactonasas de AHLs en la mayoría de las muestras genómicas (frecuencia relativa 0,99, Figura 19B). El análisis mostró un claro aumento de la frecuencia de las acilasas a 2000 m, la misma profundidad en la cual los homólogos de *LuxR* fueron más numerosos (Figura 19). Esta alta frecuencia de secuencias de acilasas, que mantuvo valores similares

durante los primeros 1000 m (0,11-0,32) pero aumentó rápidamente en los 2000 m (0,99) (Figura 19B) es responsable del aumento en el número total de secuencias de QQ a 2000 m. En cambio, las secuencias de lactonasas alcanzaron su valor máximo a los 75 m (0,22) y disminuyeron en muestras más profundas.

Con el objetivo de valorar la abundancia relativa de los genes de QQ en la columna de agua se realizó también la búsqueda de genes relacionados con el metabolismo normal de bacterias marinas, como aquellos que participan en el metabolismo oxidativo (*dmdA*) y en la adquisición de nitrógeno (*amoC*, *amt*), fosfato (*pstA*) y azufre (*dsrA*, *soxB*) (Figura 19C).

Discusión

La habilidad de los microorganismos para modular el comportamiento de la población a través de la coordinación y regulación de la expresión génica se interpreta como un mecanismo de adaptación evolutivo para sobrevivir en un medio ambiente cambiante (Cases et al., 2003). Por tanto, entender la forma en que las bacterias interactúan unas con otras es esencial para predecir su papel dentro de las poblaciones bacterianas, así como su potencial impacto en la ecología marina (Hmelo, 2017). A pesar de que los procesos de QS y QQ se descubrieron en el medio marino (Nealson et al., 1970; Givskov et al., 1996), se le ha prestado poca atención a su posible papel ecológico en este medio siendo este tema centro de controversia (Cicirelli et al., 2008; Hmelo, 2017). Las crecientes evidencias del importante papel que juegan los procesos de QS mediados por AHLs en diferentes medios marinos (Hmelo, 2017) y la alta frecuencia de actividad QQ entre las bacterias marinas aisladas de diferentes hábitats acuáticos (Skindersoe et al., 2008; Romero et al., 2011, 2012b; Weiland-Bräuer et al., 2015; Saurav et al., 2016; Torres et al., 2013, 2016) apoyan el significado ecológico del QS en un ambiente tan competitivo como el medio marino. La elevada actividad QQ puede ser interpretada tanto como el resultado de una adaptación de las bacterias con este tipo de actividad en una situación en la cual los procesos de QS aumenten la “fitness” de las especies bacterianas, o una situación en la cual la concentración de AHLs es lo suficientemente alta para constituir una fuente significativa de carbono. En trabajos previos se aisló un gran número de cepas con actividad QQ (2-46%) a partir de diferentes ambientes marinos (Skindersoe et al., 2008; Romero et al., 2011, 2012b; Weiland-Bräuer et al., 2015; Saurav et al., 2016; Torres et al., 2013, 2016). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos solo emplearon técnicas basadas en el cultivo, introduciendo un gran sesgo en la evaluación de la importancia del QQ ya que menos del 1% de las bacterias marinas son cultivables. En el presente estudio hemos comparado la producción potencial y la degradación de AHLs en bacterias aisladas del mar Mediterráneo a diferentes profundidades a través de métodos de cribado usando bacterias biosensoras, con la presencia de genes relacionados con el QS y el QQ encontrados en la búsqueda de los metagenomas de estas mismas muestras marinas. Este estudio simultáneo permite obtener una valoración más completa de la posible prevalencia de estos procesos de comunicación bacteriana, evitando las limitaciones, tanto de las técnicas basadas en el cultivo bacteriano, como aquellas basadas en las búsquedas metagenómicas. Mientras que el análisis de las bacterias cultivables estudia un pequeño porcentaje de la población total y permite evaluar la producción/degradación de señales *in vitro* (que puede definir lo que ocurre en el medio natural), los resultados obtenidos del análisis metagenómico no tienen en cuenta la posible promiscuidad de sustrato en las secuencias obtenidas y si realmente estos genes se expresan en condiciones ambientales.

Se observó una mayor densidad bacteriana en la muestra afótica de 2000 m (hasta $5,64 \times 10^3$ UFC/mL) en comparación con la muestra fótica de 90 m (hasta $0,6 \times 10^3$ UFC/mL), a pesar de no haber usado técnicas de cultivo específicas para cepas psicrófilas o barófilas. El medio de cultivo empleado para la estimación se reveló como un factor importante para la identificación de cepas con actividad QS y/o QQ, como se deriva de los resultados obtenidos en la muestra de 2000 m y en estudios previos en el Océano Atlántico (Romero et al., 2011, 2012). Se observó la tendencia opuesta en la cuantificación de bacterias heterotróficas realizada con citometría de flujo, en la cual se obtuvo 3 veces más bacteria a 90 m que a 2000 m (Haro-Moreno et al., 2018). Esta discrepancia refleja una mayor densidad de bacterias cultivables, probablemente bacterias copiotrofas, en la muestra afótica, lo que se ve apoyado por el hecho de que el mayor número de bacterias obtenido para la muestra afótica se obtuvo en los medios ricos en carbono AM y FAS-POL. En la muestra de 2000 m, la cantidad de P total y N disponible fue mayor ($0,5 \mu\text{M}$ y $8,6 \mu\text{M}$ respectivamente) en comparación con la muestra de 90 m ($0,25 \mu\text{M}$ y $6,9 \mu\text{M}$), lo que también explica la mayor cantidad de UFC/mL obtenida en la zona afótica. Por el contrario, la cantidad de POC es menor en la muestra de 2000 m ($0,94 \text{ mg C/L}$ contra $1,35 \text{ mg C/L}$) lo que indica que este es un ambiente altamente competitivo, con una disponibilidad de nutrientes limitada.

A pesar de que en el análisis metagenómico se encontraron diferencias en la estructura de la comunidad dependiendo de la profundidad (Haro-Moreno et al., 2018), la diversidad de las cepas aisladas fue muy similar tanto a 90 como a 2000 m perteneciendo la mayoría de cepas a Proteobacteria y a Firmicutes. Esta diferencia no es inesperada, dado que solamente el 1% de los microbios marinos pueden aislarse utilizando medios artificiales, mientras que la gran mayoría de ellos permanecen incultivables (Amann et al., 1995). Además, el empleo de los metagenomas evita el sesgo propio de las técnicas de cultivo, las cuales priorizan el crecimiento de los microbios con estrategia r, que se espera dominen la población cultivable. Las Proteobacterias fueron el linaje más abundante en ambos métodos, análisis metagenómico (43%) y colección de bacterias cultivables (52,38%). Sin embargo, el porcentaje asociado a Firmicutes representó menos del 1% en la diversidad de los metagenomas mientras que esta clase representó el 30% de la población bacteriana cultivable. Además, mientras las Alphaproteobacterias dominaron la población del mar Mediterráneo, disminuyendo su abundancia con la profundidad (Acinas et al., 1999; Haro-Moreno et al., 2018), en la colección de cultivables este grupo solo representó el 18% no detectándose diferencias entre la muestra fótica y la afótica.

Los resultados obtenidos de las colecciones bacterianas de 90 y 2000 m de profundidad del mar Mediterráneo mostraron un alto porcentaje (20,84%) de cepas con la habilidad de activar la bacteria biosensora de AHL *A. tumefaciens* NTL4. A pesar de que las condiciones de cultivo podrían afectar fuertemente a la producción de AHLs y que la detección de estas moléculas en los cultivos no garantiza que las mismas se produzcan en condiciones ambientales, los resultados sugieren que los sistemas mediados por AHLs podrían ser un sistema de coordinación común dentro de las comunidades bacterianas marinas (Girard et al., 2019). Debe de tenerse en cuenta que el cribado utilizando placas microtiter no permite un gran crecimiento y por lo tanto el número de cepas productoras de AHLs podría haberse subestimado al menos en condiciones de laboratorio, lo que se ha demostrado al identificar positivos adicionales cuando estas han sido cultivadas en sistema de mayor volumen. La mayor abundancia de posibles cepas productoras de AHLs se encontró en la muestra fótica, 90 m (37,66%) en comparación con la muestra de mayor profundidad (4,01%). Una menor disponibilidad de P y una mayor densidad bacteriana podrían justificar la mayor prevalencia de los mecanismos de QS a 90 m, ya que se ha

propuesto que las AHLs median y coordinan los mecanismos de procesamiento y adquisición de P (Van Mooy et al., 2012). La prevalencia de los sistemas de QS ha sido demostrada en condiciones de nutrientes deficientes (Diggle et al., 2007), lo que se podría correlacionar con la mayor actividad putativa de QS encontrada en condiciones de laboratorio entre los aislados obtenidos con los medios oligotróficos AM1/100 y FAS-POL.

El cribado para la detección de aislados con actividad QQ mostró que el 38,24% de las cepas fueron capaces de interceptar la señal de cadena larga C12-HSL. A pesar de que la presencia de AHL fue también detectada en sobrenadantes de algunas de estas cepas con actividad QQ, esta no puede ser la responsable de los efectos inhibitorios observados en estas cepas dado que la actividad se mantiene en el extracto celular y difícilmente se puede alcanzar una concentración de señal que contrarreste la alta concentración de AHL usada en el cribado de QQ. El alto porcentaje (38,24%) de las cepas cultivables identificadas en ambas muestras con esta capacidad indica que el QQ podría ser una actividad común en el mar Mediterráneo, el cual generalmente se caracteriza por oligotrofia (Pinardi et al., 2000). Contrariamente a la actividad putativa de QS, la actividad QQ contra C12-HSL fue 1,63 veces mayor en la muestra de 2000 m (47,05%) en comparación con la muestra de 90 m (29,43%). Esta abundancia correlaciona con la baja disponibilidad de POC en a la mayor profundidad, y podría por lo tanto indicar un medio altamente competitivo en el cual la población bacteriana capaz de usar las AHLs de cadena larga como fuente de carbono podría presentar una ventaja ecológica. A pesar de que pH, salinidad, presión e intensidad de la radiación UV del agua de mar parecen tener una influencia significativa en la producción, estabilidad y percepción de las moléculas de QS (Lin et al., 2003; Cicirelli et al., 2008; Decho et al., 2010; Ransome et al., 2014), las diferencias en los parámetros físico-químicos entre ambas muestras (Haro-Moreno et al., 2018) no justifican las diferencias observadas en los procesos de QS y QQ.

Se observó una gran diferencia entre la habilidad de las cepas de degradar señales de cadena larga C12-HSL (38,24%) o cadena corta (1,93%). El porcentaje de cepas capaces de degradar C6-HSL fue similar en ambas muestras (1,73 y 2,12%). Esta baja prevalencia de cepas con amplio espectro de actividad QQ es similar al porcentaje descrito en muestras de suelo contra C6-HSL (2,5%) (Dong et al., 2002). La mayor prevalencia de la capacidad de degradar AHLs de cadena larga entre las bacterias marinas podría relacionarse con un proceso de auto-degradación que sufre el anillo lactona a un pH alto del agua de mar, lo cual afecta más rápidamente a las AHLs de cadena corta (Hmelo y Van Mooy, 2009). Por lo tanto, una degradación enzimática específica podría ser más necesaria para las moléculas de cadena larga. Estos datos apoyarían también la idea de que las señales de QS pueden usarse como una fuente adicional de carbono y energía bajo condiciones limitantes de carbono porque la degradación de las cadenas largas, como C12-HSL, contribuye más eficientemente que las más cortas al reservorio metabólico de las células.

Las cepas con actividad QQ de amplio espectro identificadas en este estudio pertenecen a Alphaproteobacteria (8 cepas), Gammaproteobacteria (1 cepa), Actinobacteria (1 cepa) y Firmicutes (1 cepa). *Microbacterium schleiferi* y *Rhodotula mucilaginosa*, aisladas de 90 y 2000 m de profundidad respectivamente, pertenecen a especies con actividad QQ descrita previamente (Morohoshi et al., 2009; Wang et al., 2010; Ghani et al., 2014; Leguina et al., 2018). Por el contrario, es la primera vez que se identifica la habilidad de interceptar la comunicación mediada por AHLs en miembros de los géneros *Planomicrobium*, *Sphingopyxis*, *Erythrobacter*, *Pantoea* y *Citromicrobium*. La

diversidad taxonómica de las bacterias marinas con actividad QQ de amplio espectro es mucho mayor que en muestras de suelo y plantas (Romero et al., 2011; Torres et al., 2013; Saurav et al., 2016), donde los aislados han sido principalmente identificados como miembros del género *Bacillus* (Dong et al., 2002; D'Angelo-Picard et al., 2005). Sorprendentemente, en este estudio, a pesar de que se han logrado aislar un gran número de cepas de *Bacillus* (15%), ninguno de ellos mostró actividad QQ de amplio espectro. La mayoría de las cepas con actividad QQ descritas en este estudio pertenecen a Alphaproteobacteria, incluyendo representantes de los géneros *Citromicrobium*, *Erythrobacter* y *Sphingopyxis*. Las Alphaproteobacteria representan más del 15% de las bacterias cultivables analizadas y el 25% de la diversidad metagenómica (Figura 19) (Haro-Moreno et al., 2018). Aunque la abundancia de las cepas *Erythrobacter* en la colección de bacterias cultivables es similar en ambas muestras (2,30%), sorprendentemente, aquellas aisladas de la muestra de 2000 m de profundidad presentan actividad QQ en mayor frecuencia (5 cepas contra 1). La existencia de diferencias en la actividad QQ entre especies del mismo género ya han sido descrita con anterioridad (Mayer et al., 2015) y en este caso, la mayor actividad observada entre las bacterias aisladas a mayor profundidad apoya el valor adaptativo de esta actividad en hábitats de carbono limitado. En cuanto a la actividad enzimática presente en el PCE de las cepas con actividad QQ de amplio espectro, la bacteria *Sphingopyxis* sp. 2E12 y la levadura *Rhodotorula* sp. 2F1 presentaron la mayor actividad QQ dado que su CMA fue de 18,67 y 17,6 μg PCE proteína/mL, respectivamente. Este valor es similar al CMA de *Tenacibaculum* sp. 20J (10 μg PCE proteína/mL), una bacteria con una alta actividad de QQ de amplio espectro (Romero et al., 2014; Mayer et al., 2015, 2018; Muras et al., 2018b). La capacidad de las levaduras para inactivar AHLs se ha descrito recientemente, siendo al parecer una actividad ampliamente distribuida (Leguina et al., 2018). Sin embargo, los genes y las enzimas implicados aún no han sido caracterizados por lo que sería interesante continuar con su búsqueda de futuros trabajos.

La secuenciación del genoma de las bacterias con mayor actividad QQ, *Sphingopyxis* sp. 2E12 y *Erythrobacter* sp. 4B4, permitió la identificación de varios genes putativos de QQ, incluyendo tanto lactonasas como acilasas (Parga, 2019). A partir de ambas cepas se consiguió subclonar con éxito las lactonasas SphiA (*Sphingopyxis* sp. 2E12) y EryF2 (*Erythrobacter* sp. 4B4) en la cepa de sobre-expresión *E. coli* BL21DE3. Sin embargo, únicamente SphiA, que presenta una homología del 60% con qsdS de *Sphingomonas ursincola* (Morohoshi et al., 2017), mantuvo su actividad QQ tras la sobre-expresión. Esta enzima de QQ tiene una alta actividad al presentar una CMA de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para C6-HSL en una incubación de 3 horas y demostró tener un amplio rango de sustrato ser capaz de degradar un amplio rango de AHLs, no mostrando actividad QQ únicamente contra las señales OC13 y OC14-HSL (Parga, 2019). La mayor caracterización de estas cepas marinas con actividad QQ podría contribuir a la búsqueda de nuevos compuestos anti-patogénicos con potenciales aplicaciones en el control de infecciones bacterianas de plantas (Dong et al., 2000), acuicultura (Defoirdt et al., 2007; Romero et al., 2014; Torres et al., 2016), y en el campo de la biomedicina (Ivanova et al., 2015).

Se observó un claro aumento de la presencia de secuencias putativas de QS y QQ con la profundidad de la muestra. La relevancia de estos genes es especialmente evidente en las muestras afóticas, en las cuales la abundancia de las secuencias de QS y QQ es mayor que aquellos relacionados con el azufre (*dsrA* and *soxB*), nitrógeno (*amoC*) y metabolismo oxidativo (*dmdA*). La frecuencia similar de enzimas de QQ en relación con otros procesos importantes podría sugerir una potencial relevancia de estos procesos en el mar, principalmente en aguas profundas. Se necesitarían análisis de

metatranscriptómica para discernir si estos genes de QS y QQ se expresan en el medio marino.

Mientras los datos metagenómicos son consistentes con la mayor actividad QQ encontrada entre las bacterias cultivables a mayor profundidad, se encontró una fuerte discrepancia entre la presencia de genes de QS en la muestra de 2000 m, y la más baja actividad putativa de QS en las bacterias cultivables de la misma muestra. Como se explicó anteriormente, la desviación derivada de las condiciones y de los medios de cultivo *in vitro*, no siendo representativa del medio marino natural, es inevitable. Un estudio reciente sobre cuatro cepas diferentes de *E. coli* mostró que el 47% de la varianza en los niveles de expresión dependía principalmente del ambiente (genes dependientes del medio) (Feugeas et al., 2016; Girard et al., 2019). Por lo tanto, los experimentos *in vitro* realizados en el presente trabajo indican la capacidad de un alto porcentaje de cepas marinas de activar los sensores de AHLs y también de interceptar este tipo de moléculas. Sin embargo, son necesarios más estudios *in vivo* para confirmar y completar nuestro conocimiento relativo al rol y relevancia de los procesos de QS mediados por AHLs en el medio marino.

El alto porcentaje observado de cepas cultivables con actividad QS dependiente de AHL y QQ apoyan fuertemente la relevancia de esta actividad en el medio marino. Sin embargo, los resultados derivados de los análisis metagenómicos deben de ser interpretados con precaución. Primero, la detección de secuencias con alta similitud no asegura la conservación de la funcionalidad o la expresión del gen bajo condiciones naturales. Segundo, dado que se pueden atribuir otras actividades bioquímicas a las enzimas de QQ, la alta prevalencia de estas no puede ser relacionada inequívocamente con la degradación de AHLs. En este sentido el metagenoma del mar Mediterráneo analizado ha presentado un mayor número de acilasas que de lactonasas, a pesar de la mayor diversidad de lactonasas descritas hasta el momento (Romero et al., 2015; Grandclément et al., 2016). Ya había sido publicada previamente una mayor prevalencia de las acilasas en las secuencias GOS (Romero et al., 2012), a pesar de que en aquel momento el número de lactonasas conocidas era mucho menor al actual. Típicamente, se ha considerado que las acilasas de AHL tienen una especificidad de sustrato mayor que las lactonasas siendo las acilasas definidas como degradadoras exclusivas de AHLs. Sin embargo, la reciente identificación de acilasas con un amplio rango de especificidad, pudiendo también degradar penicilina G (Park et al., 2005; Mukherji et al., 2014) ha añadido complejidad al papel metabólico de las acilasas de AHL. Esta promiscuidad de sustrato podría explicar parcialmente esta mayor frecuencia y poner en duda la actividad exclusiva de estas enzimas sobre la degradación de las moléculas de QS tipo AHL. Por lo tanto, y a pesar de que los datos obtenidos del análisis metagenómico parecen confirmar la mayor prevalencia de la actividad QQ en las aguas más profundas, este resultado se debe de interpretar con precaución hasta que la actividad QQ de alguna de las secuencias identificadas pueda ser confirmada.

La presencia de los tres tipos de sintasas de AHL fue muy baja en toda la columna de agua en el presente estudio. El análisis de los metagenomas de las bases de datos de los océanos Atlántico, Pacífico e Índico (Doberva et al., 2015) mostraron que los genes de QS *LuxI*, *AinS* y especialmente *HdtS* están más presentes en las bacterias marinas de lo que se sospechaba inicialmente sobre la base de las bacterias cultivables, y estos se identificaron más frecuentemente (0,02-14,8) en comparación con este trabajo (0,01-0,17). Como se ha descrito previamente para la variabilidad de la actividad QQ, las diferencias en la disponibilidad de nutrientes, así como las condiciones físico-químicas

pueden ser responsables de estas diferencias entre sitios de muestreo, aunque no se pueden descartar las diferencias en la metodología como una fuente significativa de variación. Los receptores de AHL fueron mucho más comunes que las sintasas de AHL en las muestras del mar Mediterráneo, especialmente a 2000 m de profundidad, lo que se correlaciona con una mayor abundancia de genes de QS y actividad QQ. De acuerdo con este desequilibrio entre las sintasas y los receptores de QS, un estudio previo mostró que de 68 genomas de Proteobacteria estudiados, 45 contenían homólogos LuxR huérfanos pero ningún LuxI adicional, mientras que el 66% mostró más homólogos de LuxR que de LuxI (Case et al., 2008). Este desequilibrio entre sintasas y receptores puede ser atribuido a la gran prevalencia de los receptores huérfanos de LuxR en la población bacteriana. Los microorganismos con un LuxR huérfano no pueden regular directamente la síntesis de AHL, pero pueden participar en la comunicación bacteriana. Además, se han descrito que otras moléculas pueden activar también receptores homólogos de LuxR (Brameyer et al., 2015). Sin embargo, en vista del gran desequilibrio entre el número de sintasas y receptores identificados en los metagenomas del mar Mediterráneo y el elevado porcentaje de cultivables que producen AHLs *in vitro*, la hipótesis de la existencia de otras sintasas de AHL aún desconocidas no puede ser excluida.

Sorprendentemente, y a pesar de que *Vibrio* representa el 3,5% de la población bacteriana en las muestras analizadas, no se encontró ningún homólogo de LuxS en la columna de agua, lo que indica que los procesos de QS mediados por AHL son más abundantes en el medio marino que los sistemas mediados por AI-2. Corroborando con este resultado, la presencia de homólogos de LuxS solo se detectó en 3 de los 13 puntos de muestreo incluidos en la base de datos GOS, con una frecuencia normalizada de 0,7 (Doberva et al., 2015). Estos datos sobre la prevalencia del gen *LuxS* contrastan con las 653 secuencias de *HdtS* (14,8) identificadas en el mismo estudio, confirmando que los procesos mediados por AHL son más frecuentes que los mediados por AI-2 en el medio marino (Doberva et al., 2015).

El alto porcentaje de cepas aisladas con la habilidad de activar el biosensor de AHLs y de interferir con las AHLs de cadena larga en el mar Mediterráneo, combinado con la alta frecuencia de genes de QS y QQ que correlacionan con una baja disponibilidad de P, indican que tanto el QS como el QQ son estrategias comunes en el hábitat marino, pudiendo conferir una ventaja competitiva en condiciones oligótroficas. Además, el análisis de los metagenomas indica que los procesos de QS y QQ tiene un rol importante en los hábitats marinos profundos. Estudios ecológicos sobre la actividad del QS y del QQ, así como la identificación de más secuencias relacionadas con el QS y QQ en el medio marino probablemente podrían proporcionar un conocimiento clave para elucidar la importancia ecológica de los procesos mediados por AHL en el medio marino.



CAPÍTULO 2. INTERFERENCIA CON EL SISTEMA AI-2 PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE LA PLACA DENTAL CARIOGÉNICA

Antecedentes

Dentro de la cavidad oral conviven entre 500 y 1000 especies bacterianas, entre las que destacan los *Streptococcus*, que juegan un papel muy importante como colonizadores primarios ya que son los encargados de iniciar la formación de la placa dental sobre la superficie limpia de los dientes. Aunque durante muchos años se ha considerado a *S. mutans* como único responsable de la aparición de las caries (Hamada y Slade, 1980; Yoshida et al., 2005), recientemente estudios basados en ADN y ARN obtenidos de lesiones cariogénicas han indicado que esta bacteria solo representa una pequeña fracción de la comunidad bacteriana presente en dichas lesiones (Simón-Soro et al., 2014).

La formación de la biopelícula en *S. mutans* está controlada por dos sistemas de QS, cuya jerarquía es desconocida. Uno es el sistema típico de *Streptococcus*, que está mediado por el péptido estimulador de la competencia (CSP, *competence simulating peptide*) (Li et al., 2001), que es detectado por una histidina-kinasa (HK) (Petersen et al., 2004). La inactivación de cualquiera de los genes de QS implicados en este sistema causa una alteración en la arquitectura de la biopelícula (Li et al., 2002). La otra señal de QS que participa en la formación de la biopelícula de esta bacteria es AI-2 (Merritt et al., 2003; Yoshida et al., 2005; Huang et al., 2009), que también está presente en una gran cantidad de microorganismos procariontes (Schauder et al., 2001; Federle y Bassler, 2003), incluyendo importantes patógenos orales (Frias et al., 2001). La mutación del gen *LuxS*, responsable de la síntesis de AI-2, afecta a la formación de la biopelícula de *S. mutans* (Merritt et al., 2003; Sztajer et al., 2008). Sin embargo, debe de tenerse en cuenta que *LuxS* también es una enzima clave en el metabolismo de la metionina (Pereira et al., 2013) y participa en la síntesis de proteínas, ARN y ADN (Sztajer et al., 2008), y por lo tanto los efectos observados cuando se muta este gen deben de ser interpretados con cautela.

Se han propuesto diferentes compuestos naturales para utilizar como agentes preventivos en odontología (Kouidhi et al., 2015) y en particular contra las biopelículas de *S. mutans* (Koo y Jeon, 2009; Liberio et al., 2011; da Cunha et al., 2013). Sin embargo, en la mayoría de los casos descritos, la inhibición se debe a un efecto sobre el crecimiento bacteriano asociándose a una pérdida de la viabilidad celular. En cuanto a inhibidores de QS, se ha descrito el uso de furanonas capaces de bloquear la comunicación bacteriana mediada por AHL y AI-2 (Givskkov et al., 1999; Zang et al., 2009). Un estudio previo sugiere que la inhibición sobre la biopelícula de *S. mutans* observada cuando se añade la furanona C52 está relacionada con una interferencia de los procesos controlados por AI-2 (Lönn-

Stensrud et al., 2007). Sin embargo, otro estudio propone que la inhibición de la furanona C30 sobre la biopelícula de *S. mutans* debe producirse a través de otro mecanismo puesto que el mutante para luxS también se ve afectado por este compuesto halogenado (He et al., 2012). Además, el uso del compuesto natural sinefungin, que interfiere con la síntesis de AI-2, causa una alteración de la estructura de la biopelícula de *S. pneumoniae* siendo este efecto dependiente de la concentración (Yadav et al., 2014).

En el presente trabajo se estudió la capacidad de los extractos de la bacteria marina con actividad QQ *Tenacibaculum* sp. 20J para interferir con la comunicación bacteriana mediada por la señal AI-2 y prevenir la formación de biopelícula de *S. mutans*. La adhesión de esta bacteria cariogénica fue monitorizada en tiempo real usando el equipo xCELLigence®, cuyo uso para la cuantificación de biopelículas bacteriana se ha validado recientemente midiendo la cantidad de biomasa de la biopelícula (Junka et al., 2012; Cihalova et al., 2015; Ferrer et al., 2016; Gutiérrez et al., 2016). Además, se realizó microscopía de epifluorescencia y confocal, así como tinción con cristal violeta como métodos tradicionales para confirmar los resultados obtenidos con el xCELLigence®. Los resultados del presente capítulo han sido parcialmente publicados (Muras et al., 2018b, Anexo). Las figuras han sido reproducidas con permiso de la editorial.



Resultados

1. Interferencia del extracto de *Tenacibaculum* sp. 20J con el sistema mediado por la señal AI-2

Se utilizó el bioensayo de bioluminiscencia para detectar la capacidad de la cepa marina *Tenacibaculum* sp. 20J de interferir en los procesos de QS mediados por la señal AI-2. En un primer experimento se observó el efecto del extracto celular acuoso de dicha cepa (PCE20J, *purified cell extract*) sobre la producción de bioluminiscencia de las cepas biosensoras *V. harveyi* BB170 y *V. harveyi* JMH597 (Henke y Bassler, 2004). La producción de luz en la cepa BB170 está mediada por las señales AI-2 y CAI-1, mientras que en la cepa JMH597 solo interviene la señal AI-2. También se observó el efecto de la adición de la furanona C30, cuya actividad inhibitoria de la biopelícula de *S. mutans* ha sido descrita anteriormente (Lönn-Stensrud al., 2007; He et al., 2012), y la enzima Aii20J, responsable de la actividad QQ contra AHLs de *Tenacibaculum* sp. 20J (Mayer et al., 2015). Además, se probó el PCE de *Tenacibaculum maritimum* (PCE_{Tm}), cepa próxima a *Tenacibaculum* sp. 20J pero que no presenta actividad QQ contra AHLs (Mayer et al., 2015). Los resultados mostraron que tras 8 horas se produce un retraso en la bioluminiscencia inducida por AI-2 en aquellos pocillos tratados con PCE20J comparado con los pocillos utilizados como control en las cepas biosensoras BB170 y JMH597 (Figura 20A). Como era de esperar, no hubo efecto de la lactonasa Aii20J sobre la producción de bioluminiscencia de la cepa BB170. Sorprendentemente, la cepa JMH597 mostró una producción de bioluminiscencia acelerada al añadir la enzima Aii20J. El PCE obtenido a partir de *T. maritimum* (PCE_{Tm}), cepa muy próxima a *Tenacibaculum* sp. 20J, no mostró tampoco actividad inhibitoria sobre los biosensores probados.

En un segundo experimento se trató de discernir si la actividad contra AI-2 observada en el extracto de la cepa 20J era debido a un enzima u otra molécula inhibitoria. Para ello, a partir de la biomasa se realizó nuevamente un extracto acuoso (PCE), y además un extracto metanólico (MCE, *methanol cell extract*) con el objetivo de identificar una posible actividad inhibitoria no enzimática. La inhibición de la bioluminiscencia mediada por AI-2 estuvo presente en aquellos pocillos tratados con PCE20J, pero se perdió al añadir el MCE20J lo que sugiere que la molécula responsable de dicha interferencia es un enzima (Figura 20B). Para confirmar que el retraso en la producción de luz es debido a la interferencia con el sistema AI-2, y no a otros factores independientes del QS como el pH o la disponibilidad de glucosa (DeKeersmaecker y Vanderleyden, 2003; Turovsky y Chikindas, 2006), se utilizó también el biosensor *V. harveyi* JAF548 que tiene el sistema de QS desacoplado de la producción de luz (Freeman y Bassler, 1999; Defoirdt y Sorgeloos, 2012). Dado que la adición de PCE20J no disminuyó la bioluminiscencia en la cepa JAF548, se puede descartar la hipótesis de que el retraso observado sobre la emisión de bioluminiscencia se deba a otros factores. Siendo por tanto la interferencia con el sistema de QS mediado por AI-2 la razón más plausible para el efecto observado del PCE20J sobre la bioluminiscencia en las cepas biosensoras BB170 y JMH597.

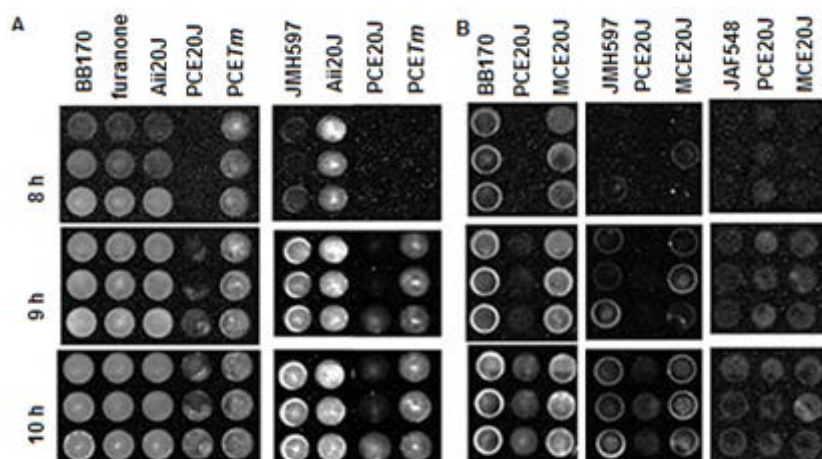


Figura 20. Imagen del bioensayo de bioluminiscencia de AI-2 usando *Vibrio harveyi* BB170, JMH597 y JAF548 como cepas biosensoras. A) Furanona, Aii20J, extracto celular acuoso de *Tenacibaculum* sp. 20J (PCE20J) y *T. maritimum* (PCE7m); B) Extractos celulares de *Tenacibaculum* sp. 20J: PCE20J (acuoso) y MCE20J (metanólico). Modificado de Muras et al., 2018b con permiso de Taylor & Francis.

Asimismo, también se descartó que el retraso en la producción de la bioluminiscencia provocada por el PCE20J sobre las cepas biosensoras BB170 y JMH597 se debiera a una inhibición en el crecimiento de las mismas. Para ello, se midió la densidad óptica de los cultivos a lo largo del experimento con/sin la adición del extracto de 20J. Se observó que añadir el extracto aumenta ligeramente la densidad óptica alcanzada en los puntos muestreados en ambas cepas (Figura 21).

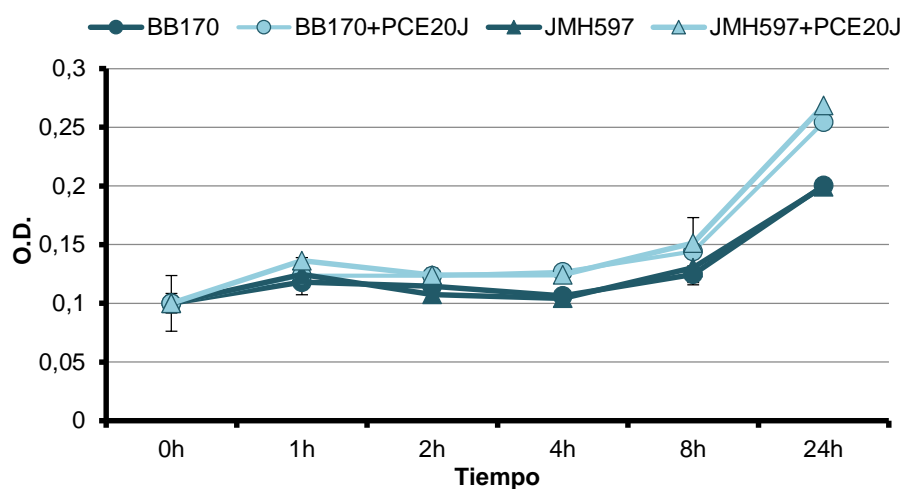


Figura 21. Efecto de la adición del extracto acuoso de *Tenacibaculum* sp. 20J (PCE20J) sobre la curva de crecimiento (600 nm) de las cepas biosensoras *V. harveyi* BB170 y *V. harveyi* JMH597 (n=3).

2. Efecto de *Tenacibaculum* sp. 20J sobre la formación de biopelícula

Dada la interesante actividad observada en *Tenacibaculum* sp. 20J contra la señal AI-2, se decidió comprobar si esta sería capaz de influir en la capacidad de adhesión de la cepa cariogénica *S. mutans*. Se probó también el efecto de la furanona C30 (0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$), considerada el prototipo de los inhibidores de QS (Givskov et al., 1996) y cuya presencia se ha demostrado que inhibe la formación de biopelícula de *S. mutans* (Lönn-Stensrud et al., 2007; He et al., 2012). Así mismo, se utilizó la enzima Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para

descartar que la actividad anti-biopelícula proceda del mismo enzima de QQ responsable de la actividad ante el sistema de QS de Gram-negativas.

En el ensayo de inhibición de biopelícula, se observó una importante reducción en el índice celular (CI, *cell index*) de *S. mutans* cuando se añade el PCE20J a una concentración de 100 µg/mL (42%) comparado con el control (100%). Por el contrario, la reducción observada con la adición del extracto de *T. maritimum* no fue significativa ($p > 0,05$). La furanona C30 no mostró efecto en la biopelícula formada por *S. mutans*, aunque redujo ligeramente la formada por *S. aureus* (16,5%) (Figura 22). Como era de esperar, la adición de la lactonasa Aii20J no causó efecto alguno sobre la adhesión de *S. mutans*.

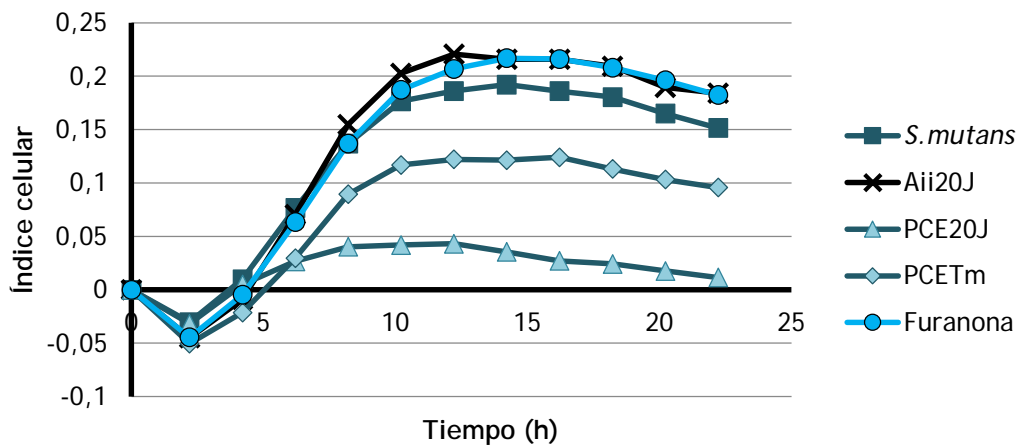


Figura 22. Formación de biopelícula por *S. mutans* en medio BHI suplementado con sacarosa 0,1% medida por el sistema xCELLigence (■). Se probó el efecto de los extractos celulares obtenidos a partir de *Tenacibaculum* sp. 20J (▲) y *T. maritimum* NCIMB2154^T (◊) (100 µg/mL); furanona C30 (○) (0,02 µg/mL) y lactonasa Aii20J (×) (20 µg/mL) (n=3). Modificado de Muras et al., 2018b con permiso de Taylor & Francis.

Adicionalmente, se midieron las densidades ópticas de los cultivos de *S. mutans* con las diferentes sustancias probadas para evaluar si los efectos observados sobre la biopelícula se debían a una reducción de dicho proceso en sí mismo o si por el contrario se estaba produciendo una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Tanto los resultados de biopelículas como los de densidad óptica se expresan como porcentaje del control. La adición del PCE20J en los cultivos de *S. mutans* resultó en una reducción significativa del 50% de la formación de biopelícula (test t de Student, $p < 0,05$) mientras que la disminución sobre el crecimiento bacteriano no fue significativa (test t de Student, $p > 0,05$) (Figura 23). Por otro lado, la furanona inhibió el crecimiento bacteriano al menos un 50% sin mostrar una reducción en la formación de la biopelícula (Figura 23). Se realizó también un ensayo de difusión, en el que el extracto de PCE20J se colocó en un disco de antibiograma posado sobre un césped de *S. mutans*. En este caso tampoco hubo un efecto sobre la viabilidad celular al no observarse halos inhibitorios alrededor de los discos (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la actividad anti-biopelícula observada en PCE20J es independiente del descenso en la viabilidad celular de *S. mutans*.

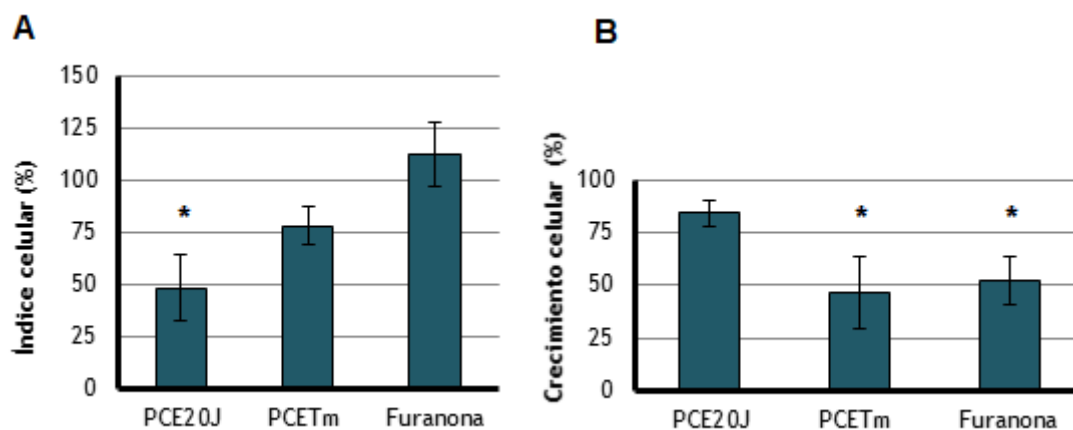


Figura 23. Efecto de los extractos de *Tenacibaculum* sp. 20 y *T. maritimum* (100 µg/mL); y furanona (0,02 µg/mL) sobre la formación de biopelícula (A) y crecimiento celular planctónico (B). Los datos se expresan como índice celular y como OD₆₀₀ (crecimiento celular) de *S. mutans* en comparación con los controles (100%) (n=3). Los experimentos se realizaron con medio BHI suplementado con sacarosa 0,1% y un tiempo de incubación de 24 h.

3. Efecto del medio de cultivo en la inhibición de la biopelícula

El medio de cultivo BHI fue suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa y glucosa (0,1% y 0,2%) con el objetivo de determinar si la presencia de estos azúcares o su concentración influía de alguna forma en la inhibición observada al añadir el PCE20J. El aumento en la concentración de ambos azúcares mejoró la adhesión de las células de *S. mutans*, obteniéndose el mayor valor de CI con la sacarosa al 0,2% (Figura 24). El PCE20J redujo la formación de biopelícula en todas las condiciones probadas, siendo esta del 50% al suplementar el medio con sacarosa (ambas concentraciones) o con glucosa al 0,2% (Figura 24). La formación de biopelícula en el medio BHI sin suplemento de azúcar fue demasiado baja como para ser detectada correctamente por el sistema xCELLigence®.

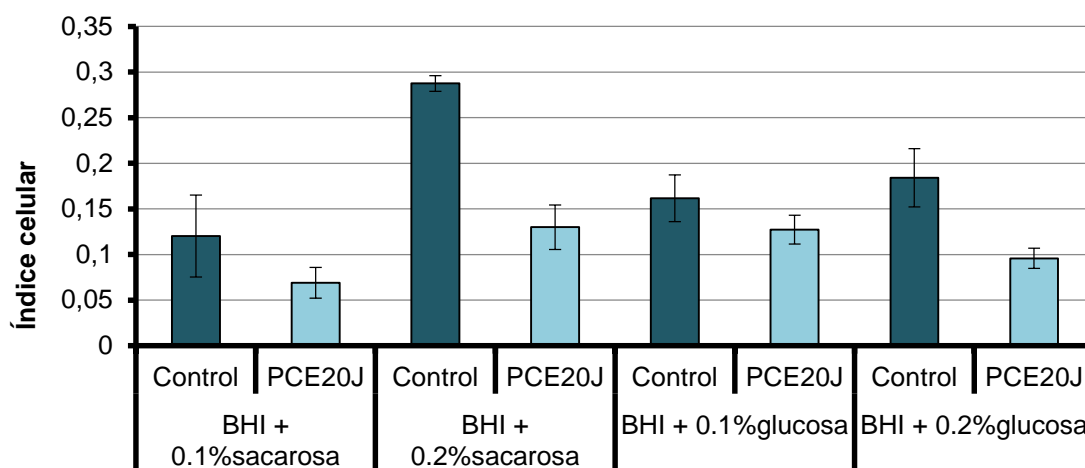


Figura 24. Efecto del extracto celular obtenido a partir de *Tenacibaculum* sp. 20J (Δ) sobre la formación de biopelícula de *S. mutans* (■) medida por el sistema xCELLigence®. El medio utilizado para inocular la bacteria fue BHI suplementado con sacarosa al 0,1% y 0,2%, y BHI suplementado con glucosa al 0,1% y 0,2% (n=3). Figura de Muras et al., 2018b con permiso de Taylor & Francis.

4. Validación de los resultados del xCELLigence®

Con el objetivo de validar los datos obtenidos con el sistema xCELLigence®, se visualizó el efecto del extracto de 20J sobre la biopelícula cariogénica de *S. mutans* utilizando microscopía de epifluorescencia y confocal (CLSM). Además, se comprobó si la actividad inhibitoria cuantificada con este equipo podría ser también detectada mediante la tinción con cristal violeta cuando la biopelícula se formaba sobre un cubreobjetos de cristal. Los resultados obtenidos en ambos métodos son claramente distintos en cuanto a la cuantificación de la biopelícula tras la adición del PCE20J. La cuantificación llevada a cabo por el sistema xCELLigence® mostró una reducción significativa (test t de Student, $p < 0,05$) de la biopelícula al ser tratada con el extracto de 20J (52%) en comparación con los cultivos control (100%). Los otros compuestos no presentaron una reducción de la biopelícula significativa (Figura 25A). A pesar de que no se detectó un cambio cuantitativo al usar la tinción con cristal violeta sobre la biopelícula de *S. mutans* tratada con el PCE20J, la observación microscópica mostró una clara alteración en su estructura (Figura 25B). Los cubreobjetos teñidos con el cristal violeta revelaron importantes diferencias no solo en la cobertura de la biopelícula sino también en el tamaño de los agregados celulares. Por tanto, utilizando estas condiciones de cultivo y esta metodología los resultados obtenidos con el xCELLigence® no se correlacionan con los alcanzados con el cristal violeta, donde no hubo una reducción en la cuantificación de la biopelícula al añadir el PCE20J. Estos datos parecen indicar que la tinción con cristal violeta presenta limitaciones en cuanto a la baja sensibilidad observada para la detección de cambios estructurales en las biopelículas.

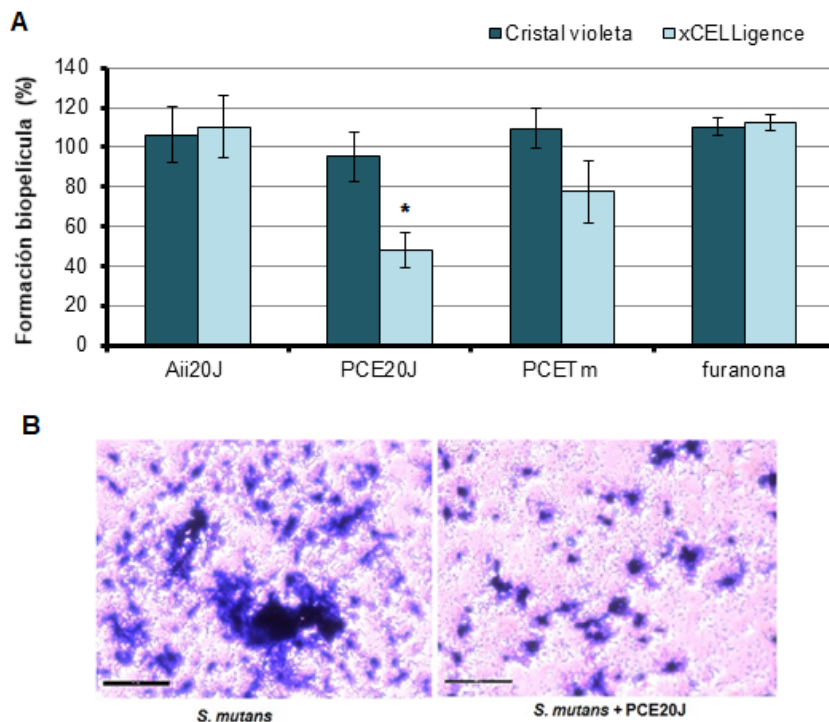


Figura 25 A) Observación al microscopio del efecto de la adición de PCE20J (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a la biopelícula de *S. mutans* teñido con cristal violeta (CV); B) Formación de biopelícula medida por xCELLigence® y cristal violeta expresado en porcentaje respecto al control (%) ($n=3$). Como compuestos anti-película se probaron extractos celulares de *Tenacibaculum* sp. 20J (PCE20J) y *T. maritimum* (PCE Tm) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) así como furanona (0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). LAS Biopelículas se cultivaron en BHI suplementado con sacarosa 0,1% durante 24 horas utilizando cubreobjetos dentro de placas petri de 35mm (A) y E-plates y placas de 96 pocillos (B). Figura de Muras et al., 2018b con permiso de Taylor & Francis.

Experimentos posteriores realizados con tinción con cristal violeta sobre la biopelícula formada en el modelo AAA modificado, que permite una mayor superficie para la adhesión bacteriana, mostraron un claro efecto inhibitorio del PCE20J sobre *S. mutans* (Figura 26). Como era de esperar la adición de la lactonasa Aii20J no redujo la formación de la biopelícula (Figura 26), poniendo de manifiesto nuevamente que la actividad del extracto PCE sobre la biopelícula cariogénica tiene que ser debida a una actividad independiente de la actividad QQ contra AHLs. El uso del sistema AAA posibilita el cambio de medio de cultivo sin alterar la formación de la biopelícula lo que permite observar más claramente los cambios producidos por PCE20J sobre la biopelícula de *S. mutans*.

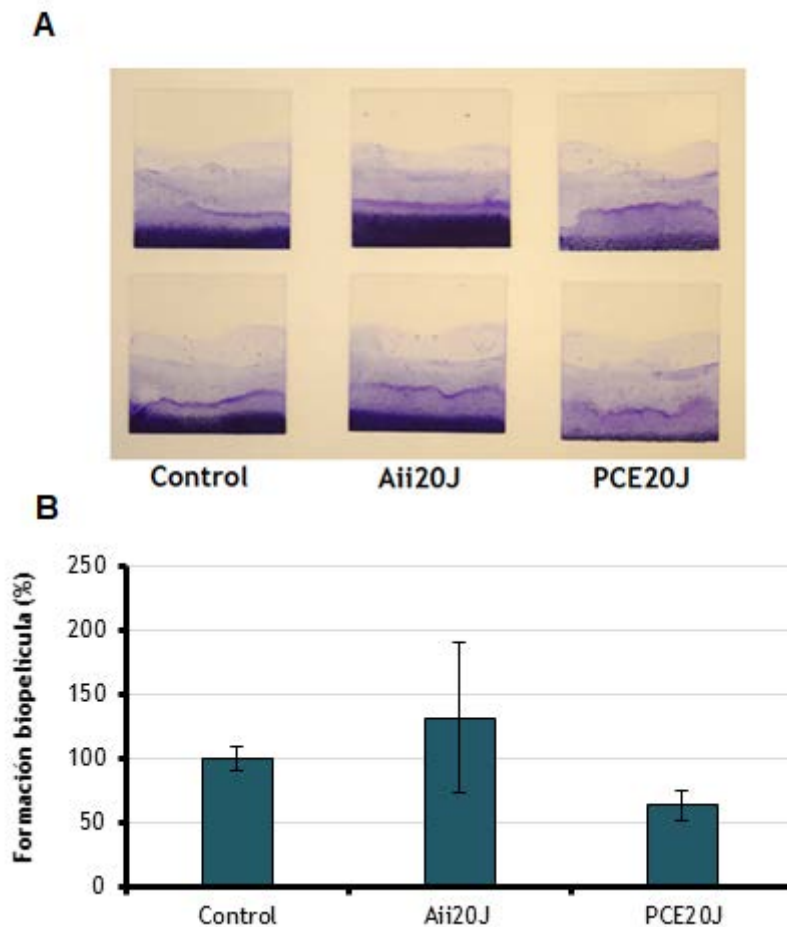


Figura 26. A) Observación del efecto de la adición de PCE20J (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a la biopelícula de *S. mutans* teñido con cristal violeta (CV); B) Formación de biopelícula medida por cristal violeta expresado en porcentaje respecto al control (%) (n=3). Como compuestos anti-película se probó el extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J (PCE20J) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las biopelículas se cultivaron en BHI suplementado con sacarosa 0,1% durante 24 horas.

Con el objetivo de confirmar los efectos del PCE20J observados previamente en el microscopio sobre la biopelícula de *S. mutans* teñida con cristal violeta, se realizó un análisis mediante microscopía confocal empleando el fluorocromo Syto9. Esta técnica nos permitió confirmar que existe una clara alteración de la biopelícula de *S. mutans* cuando se le añade el PCE20J, como son una menor superficie de cobertura y colonias de menor tamaño. Este efecto no se observó al añadir la lactonasa Aii20J (Figura 27A). Sin embargo, la dispersión de la biopelícula cariogénica formada por *S. mutans* en las placas de Petri de 35 mm utilizadas no fue uniforme, probablemente debido a la metodología,

mostrando la superficie diferente cobertura dependiendo de la zona examinada dentro de una misma condición. A pesar de esto, se visualizó una reducción mayor del 50% y un menor espesor de la biopelícula (51,38%) cuando el cultivo fue tratado con el PCE20J. En la figura 27B se muestran imágenes representativas con la mayor y la menor superficie cubierta por la biopelícula de *S. mutans* en los pocillos control (80,22%-8,76%) y en los que se añadió PCE20J (39,01%-1,82%).

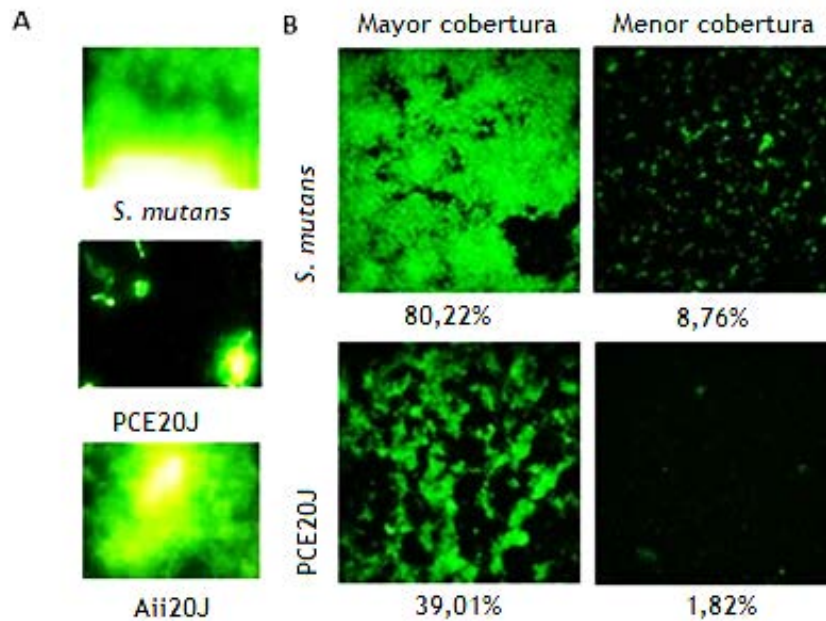


Figura 27. A) Visualización con microscopio de fluorescencia (x10) del efecto de PCE20J y Aii20J, ambos obtenidos de la cepa *Tenacibaculum* sp. 20J sobre la formación de biopelícula de *S. mutans*; B) Visualización con microscopía confocal (63x) del efecto de PCE20J sobre la formación de biopelícula cariogénica de *S. mutans*. Las biopelículas se cultivaron en BHI suplementado con sacarosa 0,1% durante 24 horas. Figura de Muras et al., 2018b con permiso de Taylor & Francis.

5. Efecto del extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J sobre otros *Streptococcus*

Con el objetivo de determinar si la actividad del PCE20J sobre la formación de la biopelícula es específica para *S. mutans*, se probó su efecto en otros estreptococos orales como son *S. oralis* DSM20627 y *S. dentisani* 7747. La biopelícula producida por estas dos cepas en BHI suplementado con sacarosa al 0,2% tras 24 horas de cultivo no fue suficiente como para poder ser medida por el sistema xCELLigence®. Por ello se decidió cultivar las biopelículas sobre cubreobjetos en placas Petri de 35 mm cuantificando por la metodología del cristal violeta, que como se comentó anteriormente puede pasar por alto cambios estructurales. Utilizando esta metodología de tinción inespecífica, se observó que el extracto PCE20J es capaz de afectar también las biopelículas de *S. oralis* y *S. dentisani* reduciendo su formación un 40% (Figura 28).

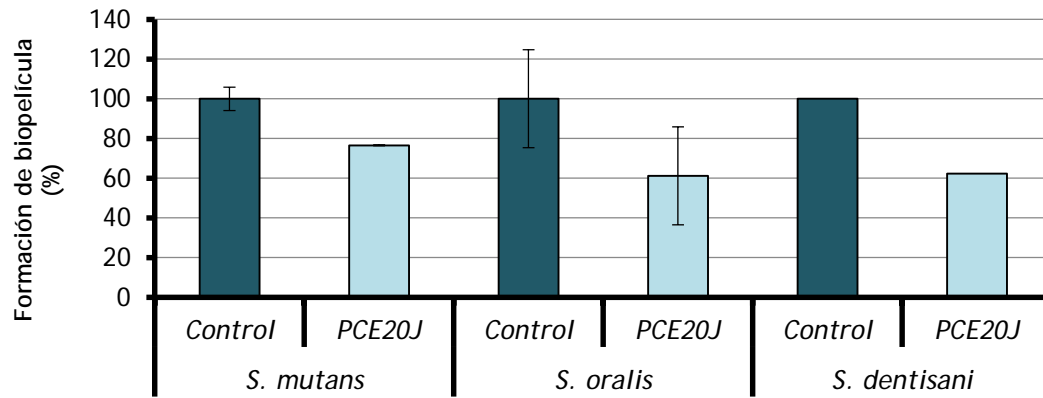


Figura 28. Efecto del extracto celular obtenido a partir de *Tenacibaculum* sp. 20J sobre la formación de biopelícula por *S. mutans*, *S. oralis* y *S. dentisani* medida mediante la tinción con cristal violeta (n=2). El medio utilizado para inocular la bacteria fue BHI suplementado con sacarosa al 0,1%. Figura de Muras et al., 2018b con permiso de Taylor & Francis.

6. Efecto del extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J sobre muestras de saliva

Dado la demostrada actividad QQ tanto contra las señales tipo AHLs (Romero et al., 2014) como contra AI-2 (Muras et al., 2018), se probó la adición del extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J (PCE20J) contra la biopelícula formada a partir de muestras de saliva de tres pacientes sanos utilizando el equipo xCELLigence® (Figura 29).

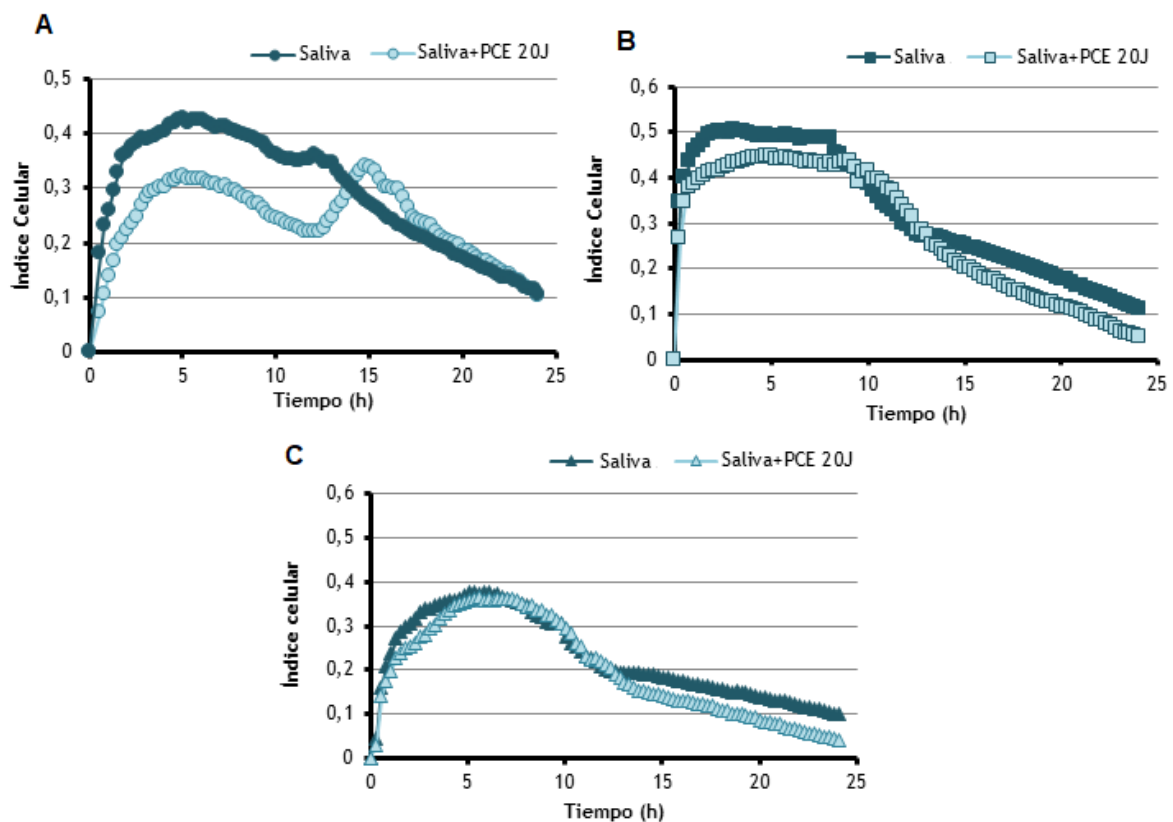


Figura 29. Cuantificación y efecto de PCE20J (100 µg/mL) en la biopelícula oral formada a partir de saliva de donantes sanos medida por el equipo xCELLigence®. El inoculo se realizó en BHI suplementado con sacarosa al 0,1% (B). La formación de la biopelícula está expresada en índice celular (n=3).

El PCE20J redujo claramente la formación de la biopelícula obtenida a partir de una muestra de saliva de un paciente sano durante las 12 primeras horas (Figura 29A). Sin embargo, este efecto no pudo observarse en salivas obtenidas de otros pacientes sanos (Figura 29B y C) en el sistema xCELLigence®. El paciente cuya saliva es susceptible a la acción del PCE20J produce una biopelícula dominada por *Streptococcus* (99%) en las condiciones probadas (Capítulo 5, Figura 78, Tabla 11). A pesar de pertenecer a un individuo fumador, la saliva del paciente 2 (Figura 29B) no presenta diferencias en la formación de la biopelícula en comparación con las otras dos muestras.

7. Caracterización del compuesto bioactivo de *Tenacibaculum* sp. 20J

Se realizó una caracterización preliminar del compuesto capaz de reducir la adhesión de *S. mutans*. A pesar de que el extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J tiene un claro efecto anti-biopelícula a 100 µg/mL, se observó que esta actividad se pierde a 10 µg/mL (datos no mostrados). Dado que el efecto del extracto celular es significativo a 100 µg/mL, los siguientes experimentos se llevaron a cabo a esta concentración. Se realizaron distintos extractos celulares utilizando diferentes solventes orgánicos (acetato de etilo, diclorometano y metanol) y se comprobó si estos mantenían tanto su capacidad para inhibir la biopelícula como su actividad QQ contra AHLs. Los tres tipos de extracto (EA-PCE, MCE y DM-MCE) perdieron no solo su capacidad de prevenir la formación de placa cariogénica sino también su habilidad para interferir con las señales de QS tipo AHL, indicando la ausencia de la enzima Aii20J y supuestamente cualquier otra enzima (Figura 30).

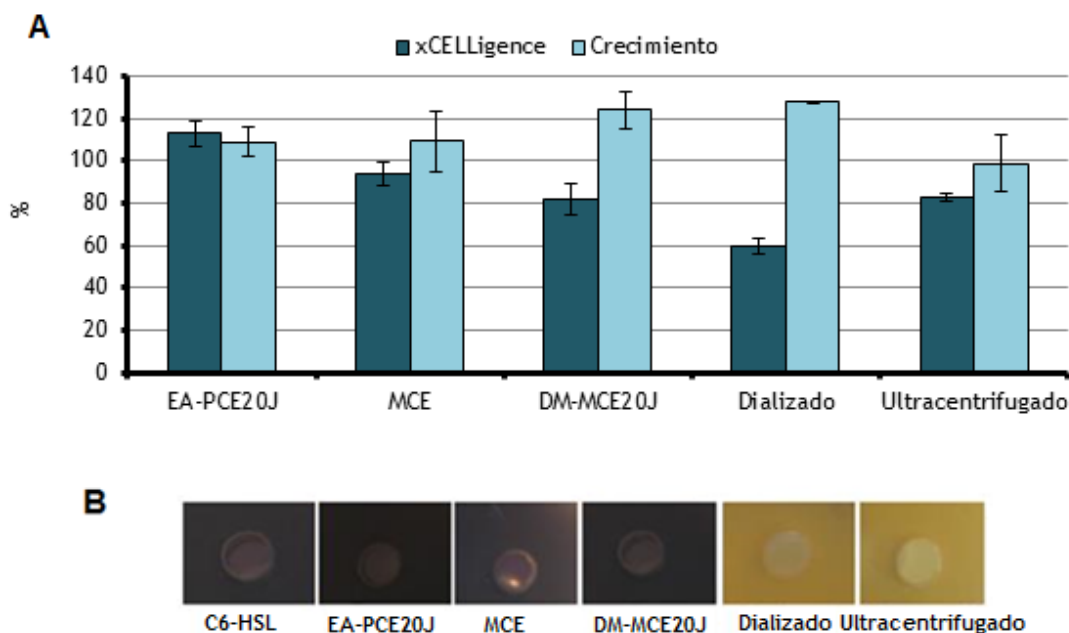


Figura 30. A) Formación de biopelícula cuantificada con xCELLigence® (barras negras) y crecimiento celular planctónico (barras punteadas). Los datos están expresados en porcentaje de índice celular (formación de biopelícula) y densidad óptica (crecimiento celular) de *S. mutans* en comparación con los cultivos control (100%). Los diferentes tipos de extractos de *Tenacibaculum* sp. 20J obtenidos usando distintos solventes como metanol (MCE), acetato de etilo (EA-PCE) y diclorometano (DM-MCE20J), y dializado y ultracentrifugado se probaron como inhibidores de biopelícula de *S. mutans* (n=3); B) Ensayo en medio sólido para la detección de actividad QQ contra AHL en los distintos extractos celular de *Tenacibaculum* sp. 20J con el biosensor *C. violaceum* CV026. La presencia de AHL fue evaluada después de 24 horas en presencia de C6-HSL 10 µM en PBS pH 6.5. Figura de Muras et al., 2018b con permiso de Taylor & Francis.

El fraccionamiento por peso molecular del PCE20J nos permitió obtener y testar 3 fracciones diferentes, <100 kDa, <50 kDa y <10 kDa. Ninguna de estas fracciones mostró una actividad similar a la obtenida con el PCE20J (Figura 31A), por lo que el compuesto bioactivo propuesto debe de estar presente en la fracción >100 kDa. Por ello, la molécula responsable de la reducción en la formación de la biopelícula de *S. mutans* contenida en el extracto de *Tenacibaculum* sp. 20J debe de tener un tamaño mayor de 100 kDa o estar asociada a otras moléculas de mayor tamaño. Para confirmar este hecho, se sometió el PCE20J a una ultracentrifugación (20 min a 300,000 g) y a un proceso de dialización (6-8kDa). La actividad observada en el extracto dializado fue muy similar al PCE20J, confirmando el gran tamaño molecular del compuesto bioactivo (Figura 31A). En cambio, al someter el PCE20J al proceso de ultracentrifugación hubo una pérdida de actividad anti-biopelícula significativa ($p < 0.05$), lo que sugiere que el compuesto puede estar ligado a membranas celulares. Se probó la actividad QQ de estos extractos contra la señal C6-HSL para verificar los pasos de diálisis y ultracentrifugación. Como era de esperar debido a la naturaleza estable de la lactonasa de AHL presente en *Tenacibaculum* sp. 20J, tanto el extracto dializado como el ultracentrifugado mantienen su capacidad de degradar las AHL (Figura 30).

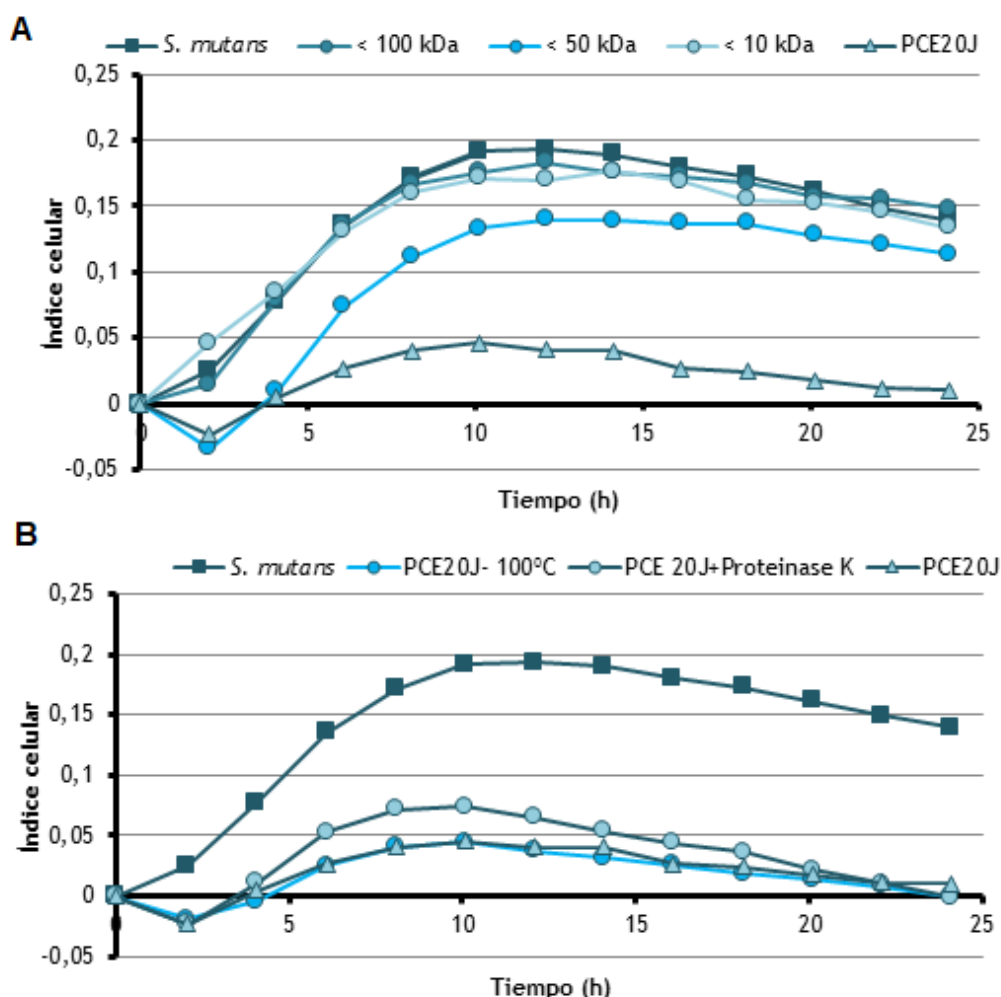


Figure 31. Efecto de los diferentes tratamiento sobre la actividad anti-biopelícula del PCE20J (100 µg/mL) contra *S. mutans* medida por el xCELLigence. A) Actividad de los extractos fraccionados por peso molecular <100 kDa, <50 kDa y <10 kDa; B) Efecto de la temperatura (100°C, 10 minutos) y tratamiento con proteinasa K (1 hora a 30°C) (n=3). Figura de Muras et al., 2018b con permiso de Taylor & Francis.

Además, se sometió al extracto de *Tenacibaculum* sp. 20J a diferentes tratamientos para después comprobar si se mantenía la actividad anti-placa. Una alícuota del PCE20J se calentó a 100°C durante 10 minutos y otra se trató con la enzima proteolítica proteinasa K a 30°C durante una hora. Tanto el calentamiento como el tratamiento con la proteinasa K no afectaron a la actividad anti-biopelícula contra *S. mutans* (Figura 31B), lo que sugiere que tanto una molécula no proteica como un enzima altamente resistente como Aii20J (Mayer et al., 2015) debe ser el responsable de dicha actividad.

Discusión

La cepa *Tenacibaculum* sp. 20J fue seleccionada por presentar una posible actividad contra la señal de QS tipo AI-2 debido a que en experimentos preliminares redujo la formación de biopelícula marina (*biofouling*) cuyas bacterias no respondieron a la acción de la enzima de QQ contra AHLs Aii20J, y de biopelícula de bacterias Gram-positivas. Esta bacteria, *Tenacibaculum* sp. 20J, presenta además multitud de actividades, entre las que destaca una amplia capacidad de degradación de señales de QS tipo AHL (Romero et al., 2011) e interesantes aplicaciones biotecnológicas como probiótico en acuicultura, como prometedor método de control de importantes patógenos Gram-negativos e incluso por ser capaz de bloquear el mecanismo de resistencia al ácido de *Escherichia coli* k-12 y la motilidad en diferentes cepas del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii* (Romero et al., 2014; Mayer et al., 2015, 2018).

Los resultados de este trabajo muestran que el extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J (PCE20J) es capaz de interferir específicamente con el sistema de QS mediado por AI-2, de forma independiente a su capacidad de degradar las AHLs. La concentración de AI-2 en el sobrenadante de *V. harveyi* puede alcanzar 22,4 μM tras 6,5 h de cultivo (Campagna et al., 2009), por lo que el retraso en la producción de la bioluminiscencia observada dentro de las diez primeras horas de crecimiento de los cultivos cuando estos son suplementados con PCE20J, sugiere la presencia de una fuerte actividad QQ contra AI-2. Cabe destacar que PCE20J no afecta a la producción de luz de la cepa *V. harveyi* JAF548 cuya bioluminiscencia es independiente de los sistemas de QS (Freeman y Bassler, 1999; Defoirdt y Sorgeloos, 2012), por lo que se descarta que la inhibición observada en los biosensores de AI-2, *V. harveyi* BB170 y *V. harveyi* JMH597, es debida a factores ambientales como son el pH o la disponibilidad de glucosa (DeKeersmaecker y Vanderleyden, 2003; Blair y Doucette, 2013).

Dado que la formación de placa dental cariogénica producida por el patógeno *S. mutans* está regulada por la señal AI-2 (Merritt et al., 2003; Yoshida et al., 2005; Huang et al., 2009), se decidió comprobar si el extracto de 20J podría interferir con dicho proceso. Los datos confirmaron dicha interferencia y parecen descartar que la reducción observada en la formación de biopelícula sea debida a una inhibición en el crecimiento ya que el extracto dializado mantuvo dicha actividad anti-placa pero aumentó el crecimiento planctónico en comparación con los pocillos no tratados. La dialización del extracto elimina pequeños azúcares y proteínas, con lo que la inhibición observada sobre la biopelícula no es debida a que estas moléculas bloqueen los receptores e superficie. Estudios preliminares, que incluyeron diálisis y ultracentrifugación, parecen indicar que el compuesto bioactivo del extracto de 20J es una molécula de gran tamaño que posiblemente se encuentra asociada a membrana. Además, dicha molécula no se ve afectada por tratamientos de inactivación térmica ni por digestión con proteinasa K. A pesar de esto, no se puede descartar que la actividad anti-placa observada en el extracto de 20J sea debida a un enzima porque estos tratamientos son incapaces de inactivar la

enzima responsable de la actividad QQ contra AHL presente en esta cepa (Mayer et al., 2015).

En este trabajo se corroboran los resultados que indican que se puede emplear el equipo xCELLigence® system RTCA para la monitorización de la formación de biopelículas producidas por *S. mutans* y otras bacterias Gram-positivas (Cihalova et al., 2015; Ferrer et al., 2016, Gutiérrez et al., 2016). Además, también se ha comprobado su posible uso para la búsqueda de nuevos compuestos capaces de prevenir la adhesión bacteriana. El equipo xCELLigence® constituye un método que consume poco tiempo y que permite una cuantificación continua y en tiempo real de la adhesión de las células, en contraste con otros métodos basados en la tinción, visualización microscópica o cuantificación de células asociadas a biopelículas *in situ* o después de haberlas desprendido del sustrato. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que mediante el sistema xCELLigence® únicamente se cuantifica la biopelícula adherida al fondo del pocillo y no se tiene en cuenta la formada en las paredes del mismo. Aunque este equipo se desarrolló inicialmente para la monitorización de células eucariotas, se ha propuesto su uso en microbiología médica (Junka et al., 2010; Cihalova et al., 2015; Ferrer et al., 2016, Gutiérrez et al., 2016). En el caso de *S. mutans*, Gutiérrez et al. (2016) ya ha demostrado la correlación entre las estimaciones de este equipo para la formación de biopelícula y otras medidas como el número de células o la tinción con cristal violeta. El efecto inhibitorio del extracto de 20J sobre la biopelícula cariogénica de *S. mutans* detectado por el xCELLigence®, confirmado por visualización al microscópico de la tinción con cristal violeta y tinción fluorescente, corrobora nuevamente la validez de este equipo para la cuantificación de la formación de biopelículas. En cambio, la cuantificación por tinción con cristal violeta mediante espectrofotometría, uno de los métodos más utilizados, no mostró diferencias entre los pocillos de *S. mutans* tratados con PCE20J y los controles cuando estos se inoculaban en placas de 96 pocillos. Las limitaciones del cristal violeta como método de cuantificación, baja reproducibilidad y tinción inespecífica de moléculas cargadas negativamente (Pantanella et al., 2013), hacen a esta técnica menos fiable debido a su baja exactitud y sensibilidad (Merritt et al., 2003). Sin embargo, estas limitaciones parecen reducirse al aumentar la superficie disponible para que tenga lugar la adherencia bacteriana.

A pesar de que se ha descrito a la furanona C30 como un compuesto con actividad inhibitoria de QS capaz de afectar también a la formación de la placa cariogénica de *S. mutans* (Lönn-Stensrud et al., 2007; He et al., 2012), esta no redujo la biopelícula de *S. mutans* medida por el equipo xCELLigence® a la concentración utilizada (0,02 µg/mL). Cabe destacar, que en estudios previos la furanona fue utilizada a una concentración mayor (0,15-4 µg/mL) que en el presente trabajo superando la concentración a la cual esta molécula presenta toxicidad $\geq 1 \mu\text{M}$ (0,2 µg/mL) (Rasch et al., 2004). Además, He et al., (2012) ha propuesto que la furanona actúa a través de un mecanismo desconocido pero que debe ser independiente de la interferencia con la señal de QS AI-2 porque esta molécula afecta tanto a *S. mutans* como a su cepa mutante para luxS. En cualquier caso, se han descrito mecanismos de resistencia contra inhibidores de QS basados en furanonas (Maeda et al., 2012), lo que unido a la toxicidad descrita para este tipo de moléculas que causan una rápida muerte en peces (Rasch et al., 2004) excluye su potencial uso como agentes antimicrobianos.

La señal de QS AI-2 juega un papel clave en la formación y desarrollo de la biopelícula de *S. mutans*. Por ello, estudios previos han puesto de manifiesto la posibilidad de prevenir y/o retrasar la formación de la placa dental cariogénica a través de la

interferencia con AI-2. Esta propuesta está apoyada por el hecho de que se ha observado que el suplemento de dicha señal a los cultivos afecta a la formación de la biopelícula, presentando una mayor cantidad de biomasa y un mayor espesor medio (Jang et al., 2013). En cambio, la adición de inhibidores de AI-2 redujo significativamente la cantidad de biomasa, el espesor medio y el espesor máximo de la biopelícula (Jang et al., 2013). Así mismo, las alteraciones observadas al añadir el PCE20J, tanto en la estructura como en la composición de la matriz de la biopelícula, presentaron las mismas características que aquellas descritas al añadir un inhibidor de QS (Jang et al., 2013). También, se ha sugerido el uso de la ribosa como agente de protección contra biopelícula de estreptococos debido a la posible competencia con AI-2 por el transportador ABC (Lee et al., 2015). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la interferencia con la señal AI-2 puede ser la responsable de la inhibición de la biopelícula de *S. mutans* causada por PCE20J. Dado que aún se desconoce la estructura de la señal AI-2 de *S. mutans* (Lönn-Stensrud et al., 2007) se necesitan un estudio en mayor profundidad para entender la interferencia entre PCE20J y el sistema AI-2. El mecanismo de inactivación podría afectar a la proteína de unión LuxP, al transcrito o directamente a la señal.

El sistema de comunicación bacteriano mediado AI-2 presenta también gran importancia en otros patógenos orales. Se ha descrito que la formación de biopelícula por una cepa *S. mutans* mutante de luxS es capaz de restaurarse no solamente por otros estreptococos sino también por *P. gingivalis* 381 y *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetencomitans* Y4 (Yoshida et al., 2005). Además, la adición exógena de la señal favoreció el crecimiento de la biopelícula y la coagregación entre las bacterias orales *Fusobacterium nucleatum* y *P. gingivalis*, *Treponema denticola* o *T. forsythia* (Jang et al., 2013), lo que indica una compleja red de señalización dentro de la placa dental. Esto apoyaría la hipótesis de Kolenbrander et al., (2006), que sugiere que altos niveles de AI-2 aceleran el crecimiento de los patógenos orales y reduce el de las bacterias comensales, lo que contribuye a la formación de la placa subgingival y al desarrollo de las enfermedades periodontales. Por lo tanto, la afectación de la placa cariogénica de *S. mutans* por el extracto de 20J podría utilizarse para prevenir las enfermedades orales y como método de control para el progreso de las infecciones crónicas orales como la periodontitis.

La interferencia con otros sistemas de QS también afecta a la formación de la biopelícula de *S. mutans*. La degradación o inactivación de CSP por otros estreptococos (Wang et al., 2011) o la adición de la señal específica de *Pseudomonas* (PQS) a cultivos de *S. mutans* (Inaba et al., 2015) interfiere con las etapas iniciales de la producción de biopelícula. Curiosamente, extractos de la planta *Achyranthes aspera*, que también presenta actividad QQ contra AHLs, mostró actividad contra la cepa cariogénica *S. mutans* KMS07. Sin embargo, dicha actividad QQ ha sido identificada por la presencia de un compuesto con alta similitud a OC12-HSL y no ha sido demostrada experimentalmente (Murugan et al., 2013). Todos estos datos indican que los circuitos de QS de *S. mutans* son altamente complejos y que se debería explorar en mayor profundidad la presencia de otras señales de QS en biopelículas de tipo mixto. Además, en el genoma de *S. mutans* se ha predicho el producto del gen *smu.46* como una proteína reguladora de la familia de LuxR, lo que sugiere la presencia de un LuxR huérfano (Wen et al., 2011), proteína homóloga de los receptores de AHL que no tiene una sintasa asociada y es capaz de interactuar con los autoinductores producidos por otras bacterias (Patankar y González, 2009).

El empleo de estrategias de QQ como uso del extracto de 20J para prevenir la formación de biopelícula por *S. mutans* y otros patógenos orales es una alternativa atractiva porque esta aproximación no produce una interferencia con el crecimiento bacteriano y por lo

tanto reduce las probabilidades de inducir una resistencia o tolerancia contra este mecanismo. Además, el amplio espectro de la actividad QQ presente en el extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J, capaz de interferir contra ambas señales de QS AHL y AI-2, podría aplicarse exitosamente para prevenir biopelículas de tipo tanto mono- o como multiespecie.



CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN DE SEÑALES TIPO ACIL-HOMOSERIN-LACTONA EN MUESTRAS Y BACTERIAS ORALES

Antecedentes

La placa dental es una biopelícula que se forma como resultado de la acumulación e interacción de los microorganismos adheridos a los dientes, bacterias y hongos mayoritariamente. Para su desarrollo se necesitan numerosos genes, incluyendo aquellos relacionados con la comunicación bacteriana conocida como *quorum sensing* (QS). Diferentes estudios han demostrado la producción de distintas moléculas de QS en diferentes microorganismos patógenos (Fong et al., 2001; Burgess et al., 2002; Merritt et al., 2003; McNab et al., 2003, Petersen et al., 2004) pero nunca se han encontrado AHLs en este tipo de bacterias (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002). Además, hasta la fecha pocos estudios han profundizado en el papel del QS en la virulencia de las bacterias orales y su relación con algunas de las patologías que tienen lugar en la cavidad oralen (Ebersole et al., 2017).

El gen LuxS, responsable de la producción de la señal AI-2, se encuentra presente en una gran cantidad de bacterias orales tanto Gram-positivas como Gram-negativas, incluyendo numerosos patógenos como *A. actinomycetemcomitans*, *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis* o *P. gingivalis*, (Fong et al., 2001; Burgess et al., 2002; Merritt et al., 2003; McNab et al., 2003; Rickard et al., 2006). Muchos patógenos orales producen y reciben AI-2 en concentraciones mayores que las bacterias comensales de la placa dental (Rickard et al., 2006) por lo que se ha sugerido que estos altos niveles de AI-2 acelerarían su crecimiento mientras que reducirían el del resto de bacterias. Se ha observado que la presencia de AI-2 producida por *F. nucleatum* aumenta la colonización de periodontopatógenos como *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia* (Jang et al., 2013). Además, en algunas bacterias como *A. actinomycetemcomitans*, especie asociada con periodontitis severa, AI-2 regula tanto la formación de biopelícula como otros factores de virulencia (Novak et al., 2010). Por lo tanto, altos niveles de AI-2 contribuirían a la formación de placa subgingival y a la transición de una comunidad microbiana comensal a una patogénica (Kolenbrander et al., 2006).

En patógenos orales Gram-positivos se han identificado diferentes AIPs, como el péptido estimulador de la competencia (*competence-stimulating peptide*, CSP) presente en varios estreptococos orales. El CSP está involucrado en la formación de biopelícula, en la síntesis de bacteriocinas, en la autólisis y en la resistencia al estrés (Petersen et al., 2004; Senadheera y Cvitkovitch, 2008; Perry et al., 2009; Senadheera et al., 2009). Estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado la importancia de CSP a la hora de

regular la formación de biopelícula en Gram-positivos ya que la inactivación de cualquiera de los cinco genes del *loci com*, responsable de su producción, secreción y detección da lugar a una biopelícula de estructura alterada y que presenta menor espesor (Li et al., 2002).

Recientemente se han encontrado AHLs, señales consideradas típicas de Gram-negativas, en cultivos de bacterias comensales procedentes de la superficie de la lengua, de la placa dental y de lesiones cariogénicas (Yin et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2013; Goh et al., 2014, 2016) aunque ninguna de estas se considera parte de la microbiota residente de la boca. También, se ha descrito un método capaz de detectar AHLs en matrices biológicas como saliva y heces de paciente sanos y pacientes con diferentes patologías gastrointestinales (Kumari et al., 2006; Struss et al., 2010). Además, existen otros indicios indirectos de la importancia de las moléculas de QS tipo AHLs dentro de la cavidad oral. Por ejemplo, la adición de AHLs al medio de cultivo de las células planctónicas de *P. gingivalis*, modifica tanto su crecimiento como su expresión proteica (Komiya-Ito et al., 2006) mientras que moléculas análogas a las AHLs reducen la formación de biopelícula en esta bacteria (Asahi et al., 2010). Esta respuesta de *P. gingivalis* ante algunos tipos de AHLs sugiere la presencia de, al menos, un receptor huérfano tipo LuxR. Aun así, se ha tomado como paradigma la ausencia de bacterias productoras de AHLs en la cavidad bucal.

En el presente capítulo se ha buscado la presencia de señales de QS tipo AHLs analizando diferentes tipos de muestras procedentes tanto de la cavidad oral como son muestras de saliva, placa dental y piezas dentales extraídas como cultivos de bacterias y patógenos orales. Para ello, se ha llevado a cabo el análisis mediante sistema HPLC-MS de diferentes tipos de muestras y se ha realizado un cribado funcional de bacterias cultivables aisladas de saliva y placa dental de un paciente sano y otro con enfermedad periodontal, y también. Además, también se han buscado secuencias relacionadas con el QS y su inhibición en genomas y metagenomas orales para intentar comprender mejor su papel dentro de la cavidad oral.

Resultados

1. Presencia de AHLs en muestras orales

El análisis mediante HPLC de muestras de saliva y placa dental obtenidas de un paciente sano y un paciente periodontal mostró la presencia inequívoca de señales tipo AHLs en la cavidad bucal (Figura 32). Los resultados mostraron la presencia de la señal OC8-HSL en las muestras de saliva obtenidas tanto del paciente sano como del paciente periodontal. Sin embargo, la señal C18-HSL solo pudo detectarse en la muestra de saliva del paciente periodontal. El análisis de las muestras de placa dental solo permitió la cuantificación de la señal OC8-HSL en la muestra del paciente periodontal.

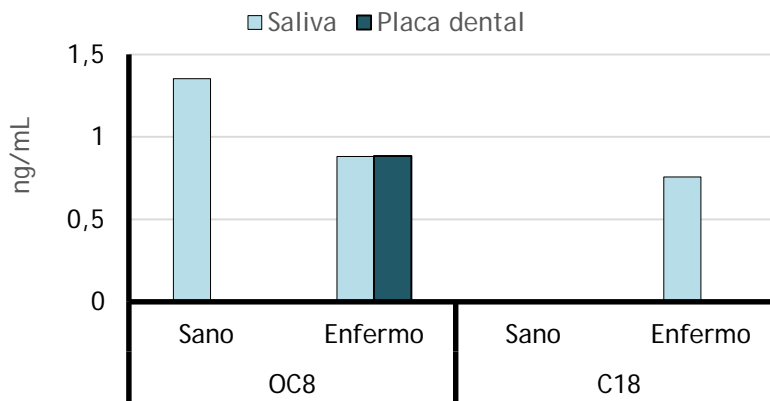


Figura 32. Detección y cuantificación de señales tipo AHLs en muestras de saliva (ng/mL) y placa dental en un paciente sano y en un paciente con enfermedad periodontal.

Una vez confirmada inequívocamente la presencia de AHLs en muestras de saliva y de placa dental, se decidió estudiar la presencia de este tipo de señales de QS en muestras de saliva obtenidas de los mismos pacientes cada semana durante un mes. Los datos revelaron una gran diferencia entre las AHLs presentes en las muestras de saliva de un mismo paciente a lo largo del tiempo (Figura 33). La primera toma de muestras, realizada después de que los pacientes estuvieran al menos 12 h sin lavarse los dientes, reveló la presencia de la señal OC8-HSL (3,57 ng/mL) en el paciente sano (Figura 33B), al igual que en el experimento previo (Figura 32). Sin embargo, no se pudieron identificar AHLs en la saliva del individuo periodontal obtenida durante la primera semana, probablemente porque durante la recogida el paciente tomó un vaso de agua que eliminó la posibilidad de detectar las señales de QS. Las muestras de la segunda semana, tomadas después de seguir la rutina habitual de salud bucodental al igual que las siguientes semanas, mostraron una gran cantidad de C8-HSL tanto en el paciente sano (832 ng/mL) como en el paciente periodontal (618 ng/mL) (Figura 33A). Aunque esta señal no se pudo identificar en la tercera semana, en la cual solo se encontró la señal HC4-HSL en el paciente sano (6,12 ng/mL), C8-HSL (16,43 ng/mL) y HC4 (8,28 ng/mL) se encontraron nuevamente en la última semana (Figura 33B).

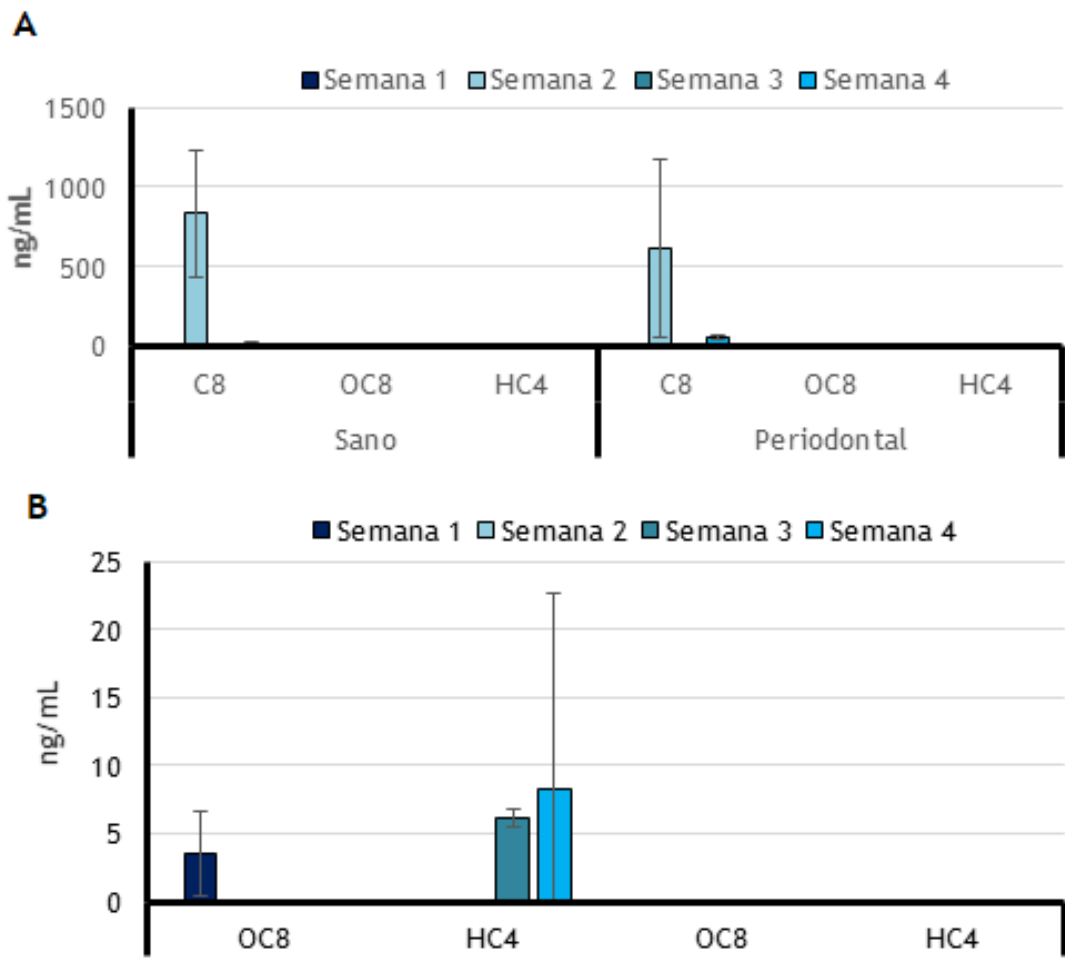


Figura 33. Detección y cuantificación de señales tipo AHLs en muestras de saliva (ng/mL) tomadas durante cuatro semanas consecutivas en el paciente sano y en el paciente con enfermedad periodontal. La primera semana se les pidió a los pacientes que se abstuvieran de lavarse los dientes al menos 12 h antes de la recogida de muestras mientras que en el resto se solicitó que siguieran sus hábitos de higiene bucal. (n=3).

Con el objetivo de encontrar una posible asociación entre el perfil de AHLs identificable en la boca y patologías orales bacterianas, se llevó a cabo el análisis de 12 muestras de saliva y de 12 piezas dentales obtenidas de los mismos pacientes (Figura 34). En estas muestras de saliva se encontraron un mayor número de AHLs que en los experimentos previos, detectándose C8, C14 y C18-HSL (Figura 34A). Nuevamente, la señal mayoritaria en casi todas las muestras fue C8-HSL que se pudo identificar en todas las salivas (4,97-200,22 ng/mL). Aquellas muestras que contenían las tres señales C8, C14 y C18-HSL procedían de pacientes que padecían al menos una lesión cariogénica. Al igual que en las muestras de saliva, el análisis de las piezas dentales extraídas presentó como señal mayoritaria C8-HSL (12,46-151,80 ng), aunque esta señal no se pudo identificar en la muestra D8 (Figura 34B).

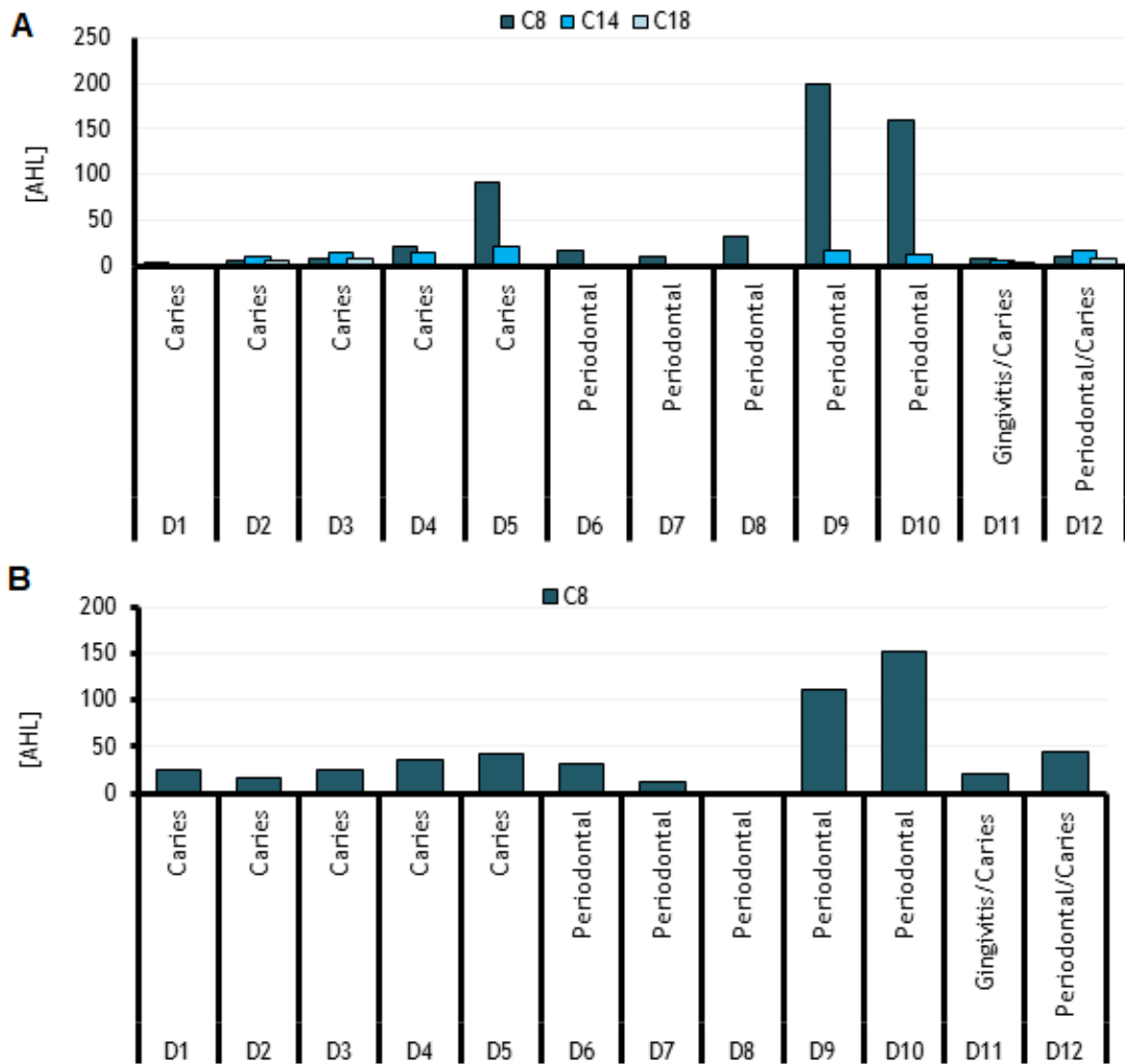


Figura 34. Identificación y cuantificación de las señales tipo AHLs (ng/mL) en muestra de saliva (A) y piezas dentales (ng) extraídas (B) obtenidas de pacientes.

2. Aislamiento de bacterias de saliva y placa dental

Tras la confirmación de la presencia de moléculas tipo AHLs en muestras de saliva y de placa dental, se decidió buscar bacterias orales capaces de producir estas señales de QS. Para ello se realizó un aislamiento de bacterias cultivables anaerobias procedentes de muestras de saliva y placa dental obtenidas de un paciente sano y de un paciente periodontal. Todas las muestras del paciente periodontal mostraron más UFC que las del paciente sano independientemente de que fueran muestras de saliva o de placa dental, presentando la mayoría de ellas el doble de carga bacteriana que las muestras del paciente sano (Tabla 7). En cuanto al medio de cultivo utilizado para el aislamiento, no se observaron diferencias en cuanto al número de bacterias obtenidas (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de bacterias cultivables (UFCs/mL) obtenidas en los medios de cultivo Agar Sangre Columbia y Agar Schaedler (SCH) suplementado con vitamina K1 y sangre a partir de muestras de saliva y placa dental obtenidas de un paciente sano y otro periodontal. Las placas de incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 7 días.

	SALIVA (UFC/mL)		PLACA DENTAL (UFC)	
	SCH sangre	Columbia	SCH sangre	Columbia
Sano	5,5x10 ⁸	5,8x10 ⁸	1,05x10 ⁹	1,5x10 ⁹
Periodontal	1,47x10 ⁹	1,5x10 ⁹	2,3x10 ⁹	1,6x10 ⁹

3. Producción de AHLs en bacterias cultivables de saliva y placa dental

Para la detección de bacterias productoras de AHL se aislaron un total de 568 cepas, 287 de placa dental y 280 de saliva, obtenidas a partir de un paciente sano y de un paciente periodontal (Tabla 8). Para el cribado funcional se utilizó la bacteria *A. tumefaciens* NTL4 que permitió la identificación de 62 posibles productoras de AHLs (29,9%) al observarse el pigmento azul característico que este biosensor produce en presencia de este tipo de señales de QS y X-GAL. (Figura 35). De estas bacterias productoras de AHLs, 45 se aislaron del paciente sano y 17 del paciente periodontal. Los resultados mostraron que hay un mayor porcentaje de bacterias productoras de AHLs en las muestras de placa dental (8,75%-21,33%) recogidas que en las de saliva (3,70%-8,96%), independiente del estado de salud del paciente. En cuanto al medio de cultivo utilizado para el aislamiento, el medio SCH permite la identificación de una mayor proporción de bacterias productoras de AHL en comparación con el medio Columbia en las cepas obtenidas del paciente sano, mientras que en el paciente periodontal se observa el caso contrario (Tabla 5).

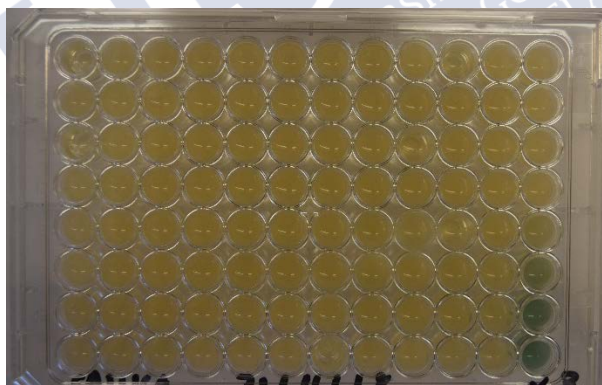


Figura 35. Cribado para la detección de moléculas de QS tipo AHLs en bacterias cultivables aisladas de saliva y placa dental usando la bacteria biosensora *A. tumefaciens* NTL4.

Se decidió realizar también un cribado de actividad QQ con el objetivo de ayudar determinar la importancia de los procesos relacionados con las AHLs dentro de la cavidad oral. Para el bioensayo se utilizó la bacteria *C. violaceum* CV026 y la señal de cadena corta C6-HSL. Los resultados mostraron que un altísimo porcentaje de estas bacterias orales (29,92%) tienen actividad QQ contra esta señal de QS (Tabla 8). De estas fue mayor la cantidad de bacterias con actividad QQ en las muestras periodontales (37,42%) que en las muestras del paciente sano (23,20%). Se observó que 12 cepas son capaces tanto de activar el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 como de interferir el sistema de QS mediado por C6-HSL. Cuatro de estas muestras fueron obtenidas del paciente sano mientras que ocho pertenecen al paciente periodontal.

Durante el cribado para la detección de AHLs se observó que numerosas bacterias orales fueron capaces de inhibir el crecimiento del biosensor *A. tumefaciens* NTL4. De estas 73 bacterias con actividad antibiótica, 44 fueron aisladas del paciente sano (5 de placa dental y 39 de saliva) y 29 del paciente periodontal (14 de placa dental y 15 de saliva).

Tabla 8. Aislados obtenidos de diferentes muestras y utilizando distintos medios de cultivo. Se muestran el número total y el porcentaje de las cepas con actividad QS y QQ contra la señal C6-HSL usando el ensayo en medio sólido con bacterias biosensoras. Medios usados: Agar Schaedler con sangre y agar Columbia.

			N° Aislados	Cepas QS	%QS	Cepas QQ C6-HSL	%QQ C6-HSL
SANO	Saliva	SCH sangre	95	12	12,6	29	30,52
		Columbia	50	1	2	18	36
		Total	145	13	8,96	47	32,41
	Placa dental	SCH sangre	103	31	30,09	18	17,47
		Columbia	47	1	2,12	3	6,38
		Total	150	32	21,33	21	14
PERIODONTAL	Saliva	SCH sangre	90	2	2,22	14	15,55
		Columbia	45	3	6,66	24	53,33
		Total	135	5	3,70	38	28,14
	Placa dental	SCH sangre	93	6	6,45	42	45,16
		Columbia	44	6	13,63	22	50
		Total	137	12	8,75	64	46,71

4. Producción de AHLs en biopelículas orales mixtas

Con el objetivo de demostrar la capacidad de producir AHLs de las bacterias cultivables presentes en la placa dental se realizó una biopelícula oral *in vitro* en medio BHI y BHI con sacarosa a partir de una muestra de saliva de un paciente sano. La adición de sacarosa al medio se realizó con el objetivo de inducir un carácter cariogénico a las biopelículas mientras la tipología de periodontal se intentó inducir mediante condiciones anaeróbicas. En estas muestras, incubadas durante 84h mientras se hacían cambios de cultivo cada 12h, se encontraron hasta 9 señales tipo AHLs diferentes. Se observa que los datos obtenidos son muy similares, independientemente de las distintas condiciones en aerobiosis/anaerobiosis y al medio de cultivo utilizado (con o sin sacarosa) en las que se realizó el experimento. El cultivo de las biopelículas en condiciones de anaerobiosis produjo una concentración total de AHLs ligeramente mayor (10,41-12,40 ng/mL) que cuando se llevaron a cabo en condiciones de aerobiosis (8,32-11,89 ng/mL). Sorprendentemente, el uso de medio de cultivo suplementado con sacarosa que debería de estar más dominado con *Streptococcus* presentó una mayor concentración total de AHLs (11,89-12,40 ng/mL) que en ausencia de este azúcar (8,32-10,41 ng/mL). La molécula identificada como mayoritaria fue la señal de cadena corta C4-HSL (4,06 – 7,35 ng/mL) pero también se encontró un amplio rango de AHLs adicionales cuya longitud de la cadena lateral fue muy variable, detectándose desde señales cortas como C4 hasta señales muy largas como C18-HSL (Figura 36). Apenas hay diferencias entre los distintos perfiles de AHLs obtenidos en las diferentes condiciones de cultivo. Solamente se encontraron diferencias respecto a la señal HC14-HSL que, aunque en muy pequeña cantidad (0,08 y 0,15 ng/mL), únicamente está presente cuando el medio de cultivo está suplementado con sacarosa, y con la señal OC18-HSL (0,33 ng/mL) solo presente en aerobiosis y BHI. Sorprendentemente, se encontró una elevada de concentración de C8-HSL en el medio de cultivo, probablemente a una contaminación cruzada durante el procesamiento de muestras para la extracción de las AHLs.

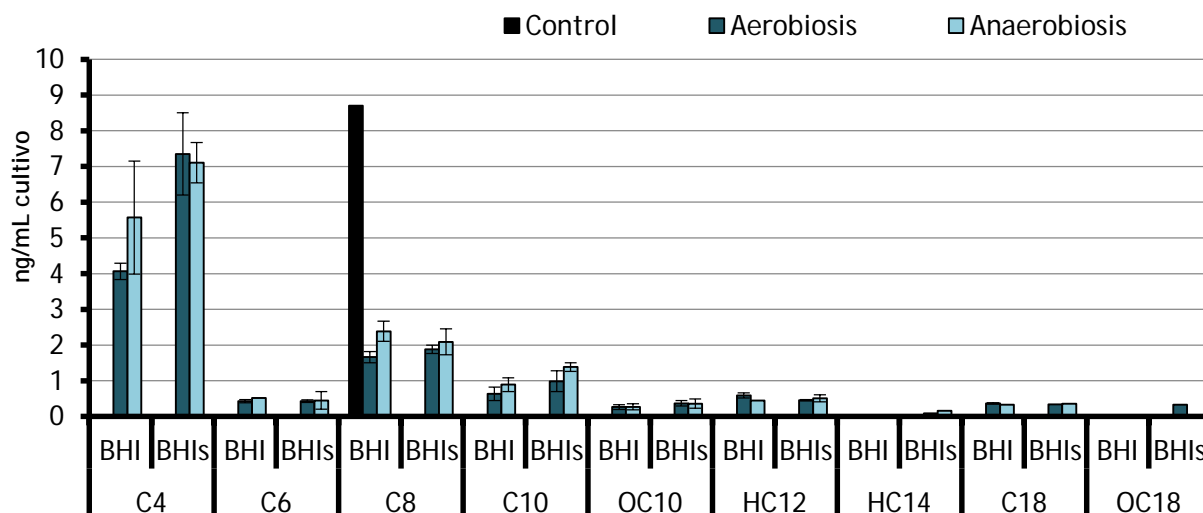


Figura 36. Detección y cuantificación de señales tipo AHLs (ng/mL) de biopelícula oral producida *in vitro* partir de saliva de paciente sano el cambio de medio realizado a las 84 h de incubación (n=3). Se realizó el cambio de medio de cultivo cada 12 h.

5. Producción de AHLs en bacterias patógenas

En vista de los resultados previos en los que se consiguió identificar la presencia de AHLs en bacterias orales cultivables y en biopelículas orales *in vitro*, se decidió buscar la presencia de este tipo de moléculas de QS en una biopelícula mixta compuesta por 6 bacterias patógenas. El análisis de la biopelícula patógena formada por *S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* mostró la presencia de la señal OC8-HSL (0,87 ng/mL).

Con el objetivo de determinar si la bacteria patógena *P. gingivalis* es la responsable de la AHL hallada en la biopelícula mixta de 6 especies, se realizaron cultivos empleando dicho patógeno oral en mono-cultivo y en co-cultivo con *S. gordonii* o con *S. oralis* (Figura 37). Los datos muestran como cuando se hace un co-cultivo de *P. gingivalis* con *S. gordonii* se aumenta la concentración de OC8-HSL (0,83 ng/mL) en comparación a cuando se hace en mono-cultivo (0,30 ng/mL). Cuando *S. oralis* se co-cultiva con *P. gingivalis* la cantidad de OC8-HSL aumenta más de cuatro veces la (1,40 ng/mL).

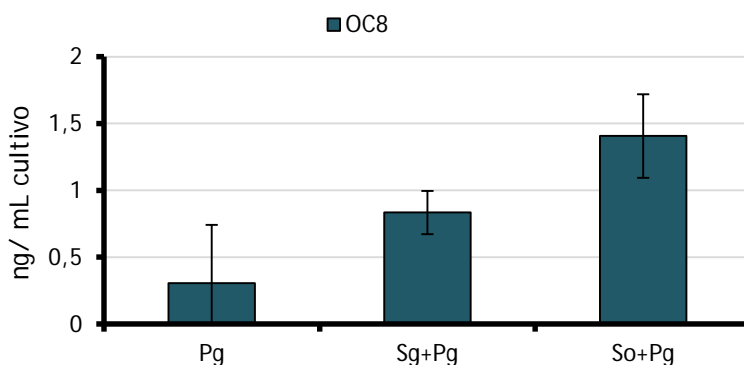


Figura 37. Detección y cuantificación de OC8-HSL (ng/mL) de un cultivo planctónico del patógeno oral *P. gingivalis* cultivado en mono-cultivo o en co-cultivo con *S. gordonii* y con *S. oralis*.

6. Identificación de genes de quorum sensing y quorum quenching en genomas y metagenomas orales

Se realizó la búsqueda de genes relacionados con sintasas (LuxI, HdtS, LuxM/AinS) y receptores de AHLs (LuxR, LuxN/AinR, QscR-SdiA), sintasa de AI-2 (luxS) y también y genes implicados en actividad QQ (lactonasas, acilasas y paraxonasas) en 700 genomas y 137 metagenomas orales. Los datos obtenidos indican que los genes de QS y QQ son muy comunes en estos metagenomas, no siendo tan comunes dentro de los genomas analizados (Figura 38A). El 99,27% de los metagenomas orales estudiados mostraron la presencia tanto de genes de QS como los receptores de AHLs (LuxR, LuxN/AinR) y las sintasas de dialectos (RpaI, Ppys, darABC), como genes relacionados con el QQ incluyendo enzimas lactonasas (familias MBL y GSDL) y acilasas (Figura 38B). Otros genes muy presentes también en estos metagenomas son la sintasa de AI-2 LuxS (98,54%), la sintasa de AHLs HdtS (97,81%), y lactonasas pertenecientes a las familias α/β hidrolasa (89,05%) y PTE (86,13%). Las otras dos familias de sintasas de AHLs, LuxI y LuxM/AinS, no se pudieron identificar en ninguno de los metagenomas analizados. Curiosamente, sola una única muestra, que fue obtenida de una lesión cariogénica, no presentó genes de QS.

Entre los genomas orales analizados LuxS es el gen más abundante de QS identificado (44,14%) (Figura 38). En cuanto a los genes relacionados con el sistema de AHLs, los valores encontrados para las sintasas (7,85%) y los receptores (8,7%) son muy similares. Al contrario de lo observado en los metagenomas orales, se consiguió identificar la presencia de la sintasa LuxI (4,14%) que presentó valores muy similares a la sintasa HdtS (3,71%) y a los receptores LuxR (3,42%) y SdiA (5,28%). En cuanto a los genes relacionados con el QQ, se observó el doble de secuencias de lactonasas (6,7%) en comparación con acilasas (3,28%).

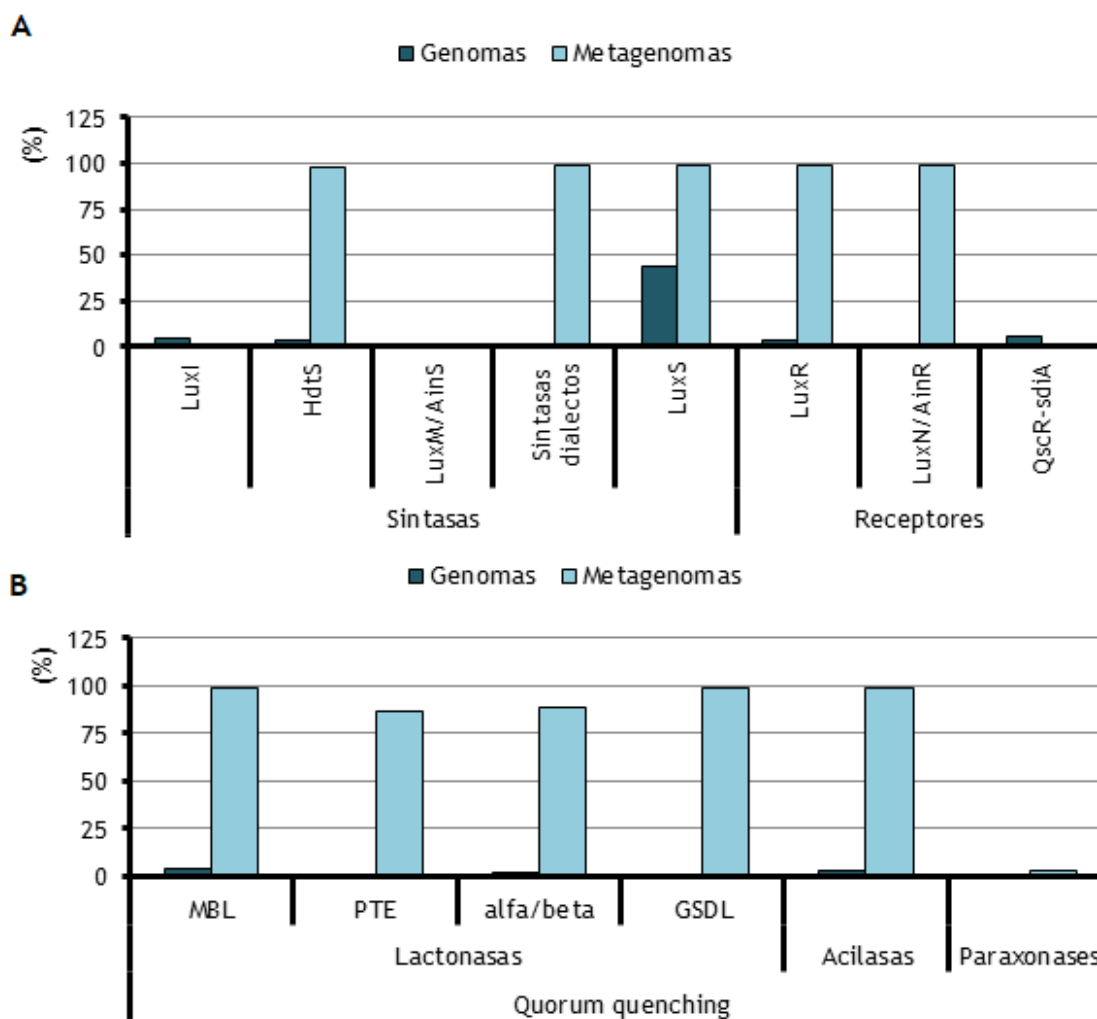


Figura 38. Porcentaje de la presencia de genes relacionados con el QS y el QQ en los genomas y metagenomas orales.

Dentro de los genes de comunicación bacteriana se observó la mayor prevalencia para el gen responsable de la producción de AI-2, LuxS (0,55). Al observar los datos de frecuencia relativa de los metagenomas analizados parece haber una relación de equilibrio entre los procesos de producción y degradación de AHLs. Los valores obtenidos de los genes relacionados con estas señales de QS fue similar, 0,26 y 0,21, respectivamente (Figura 39). HdtS fue la única sintasa de AHLs detectada en estas muestras (0,03), no pudiendo encontrarse secuencias de las sintasas LuxI o LuxM/AinS. En cambio, la presencia de los receptores de AHLs LuxR y LuxN/AinR fue bastante común (0,18). En cuanto a los genes relacionados con la inhibición del QS, las lactonاسas fueron las enzimas de QQ más numerosas (0,13), siendo más frecuentes que las paraxonاسas (0,06) y que las acilinas (0,02). Dentro de las lactonاسas, las más identificadas fueron las pertenecientes a la familia MBL (0,07).

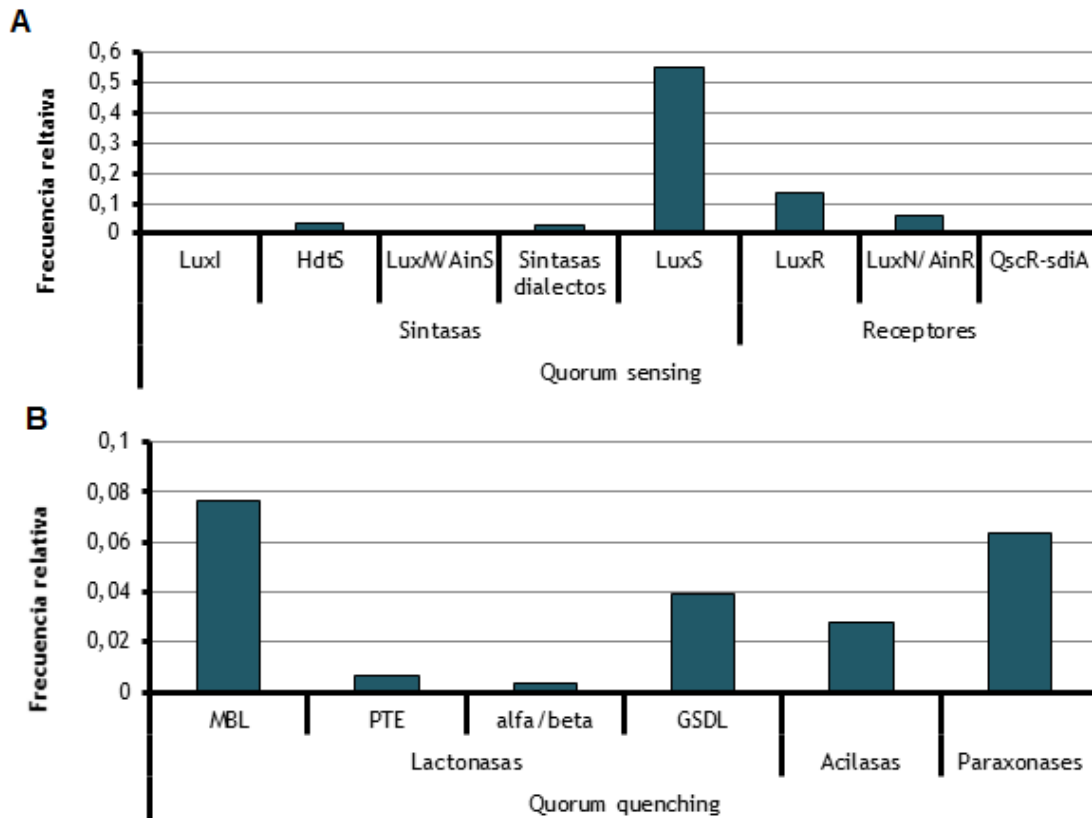


Figura 39. Frecuencia relativa de las sintasas de QS (LuxI, HdtS, LuxM/AinS, sintasas de dialectos, LuxS), receptores de QS (LuxR, LuxN/AinR y QscR-sdiA) y enzimas de QQ (lactonasas, acilasas y paraxonasas) en los metagenomas analizados. Los datos fueron normalizados en función del recuento de proteínas totales.

El análisis de los 700 genomas orales analizados mostró una alta prevalencia del gen LuxS que se encontró en 309 de ellos. Además, este gen presentó una gran distribución al presentarse en 19 de los 34 géneros a los que pertenecen los genomas estudiados (Figura 40). De estos 309 genomas analizados en los que se detectó LuxS, la mayoría pertenecen a los géneros de *Streptococcus* (22,65%), *Neisseria* (14,23%) y *Klebsiella* (13,59%). Los genes relacionados con los sistemas de QS mediados por AHLs, en cambio, se identificaron en un número mucho menor de genomas. En esta colección de genomas se pudo detectar la presencia de las sintasas LuxI y HdtS, pero no de AinS. LuxI se encontró en 29 genomas repartidos en 4 géneros, siendo *Acinetobacter* (34,48%) y *Burkholderia* (34,48%) los mayoritarios mientras que HdtS se encontró en 26 genomas repartidos en 6 géneros, *Pseudomonas* principalmente (57,69%). Se observó la presencia de LuxR en los géneros *Burkholderia* (25%), *Enterobacter* (8,3%) y *Pseudomonas* (25%) pero sorprendentemente también en las bacterias Gram-positivas *Enterococcus* (16,6%) y *Lactobacillus* (25%). Además, se encontró el receptor huérfano QsdR-SdiA en 37 genomas de 4 géneros, mayormente *Klebsiella* (43,24%) y *Escherichia* (32,43%). En cuanto a las enzimas de QQ de tipo lactonasa se identificaron en un total de 47 genomas pertenecientes a 7 géneros distintos, siendo la mayoría miembros de *Klebsiella* (31,91%) y *Acinetobacter* (21,27%). En cambio, las acilasas fueron menos abundantes estando presentes solo en 23 genomas, principalmente del género *Pseudomonas* (56,52%).

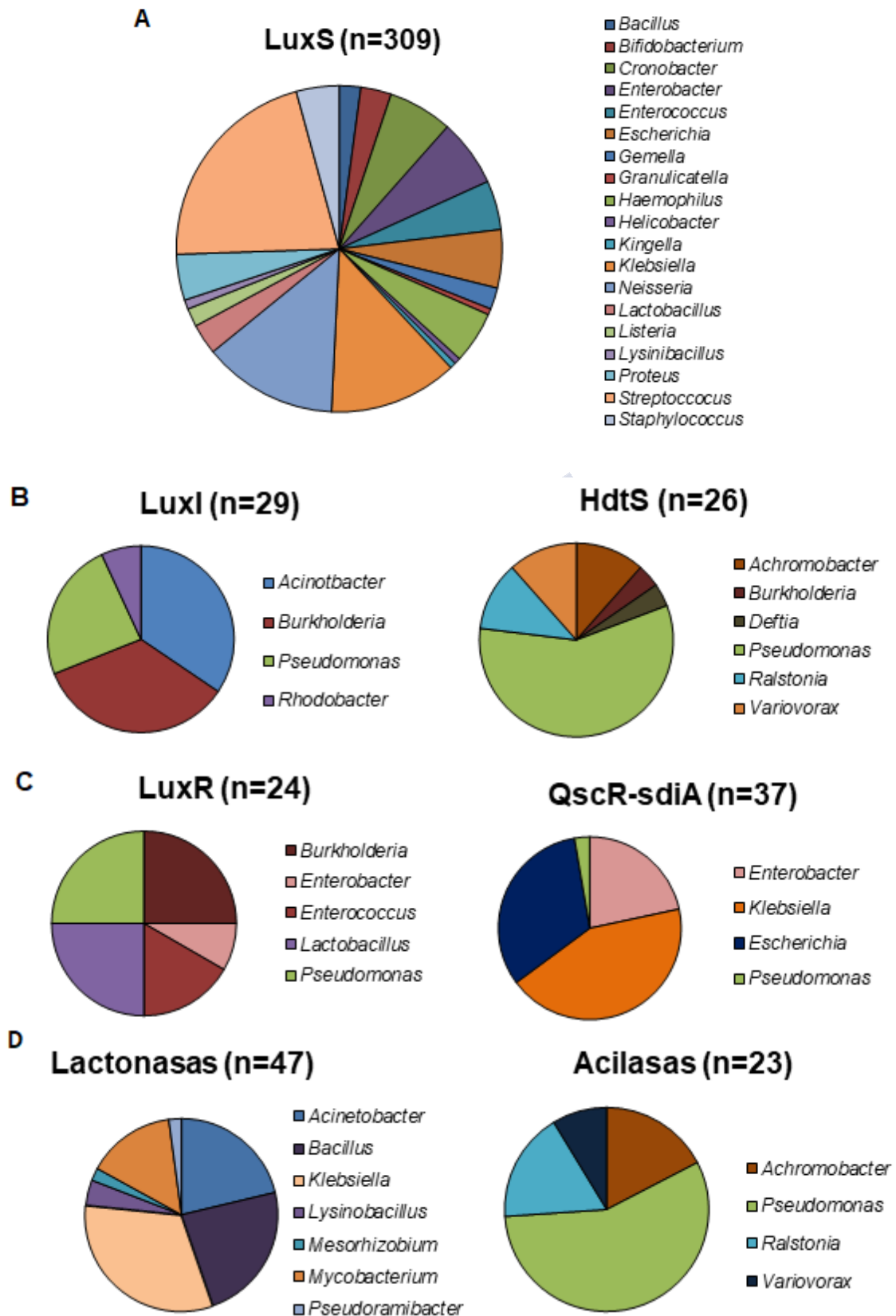


Figura 40. Representación gráfica de los géneros de aquellos genomas en los que se han identificado proteínas relacionadas con procesos de QS y QQ. Se muestra el número total de genomas que contienen la proteína de interés y el género al que estos pertenecen (n= 700).

También se realizó la búsqueda de homólogos de sintasas y receptores de AHLs, así como la sintasa de AI-2 en 5 patógenos relacionados con enfermedades orales bacterianas: *V. parvula*, *A. naeslundii*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* (Tabla 9). En todas estas bacterias, se encontraron secuencias homólogas a la sintasa HdtS con identidades mayores al 25% y en *P. intermedia* también se encontró un homólogo de LuxI. Curiosamente, no se identificaron receptores de AHLs en los patógenos de *A. naeslundii* y *P. gingivalis*. Esta búsqueda permitió la identificación de homólogos de AI-2 altamente conservados en *A. naeslundii*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.



Tabla 9. Porcentajes de homología con sintasas y receptores de AHLs y de AI-2 de microorganismos relacionados con enfermedades bacterianas orales.

	<i>Veillonella parvula</i>		<i>Actinomyces naeslundii</i>		<i>Porphyromonas gingivalis</i>		<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>		<i>Prevotella intermedia</i>	
	Query cover	Ident	Query cover	Ident	Query cover	Ident	Query cover	Ident	Query cover	Ident
Sintasas de AHLs										
LuxI									44%	28%
AinS										
HdtS	74%	27%	47%	33%	79%	26%	32%	33%	71%	26%
Receptores de AHLs										
LuxR							10%	33%	26%	35%
AinR	12%	26%					47%	24%		
QsrC	54%	21%								
Sintasa de AI-2										
LuxS			83%	40%	94%	29%	97%	73%		

Discusión

La complejidad de la microbiota oral y la presencia de señales de QS dentro de la cavidad bucal han puesto de manifiesto la importancia de entender como las bacterias interaccionan unas con otras para predecir su papel en este ambiente debido a su potencial impacto en el desarrollo de enfermedades orales asociadas a placa dental. La presencia de AHLs en la cavidad oral no se ha considerado importante desde que varios autores fueron incapaces de detectar la producción de este tipo de señales de QS en bacterias orales patógenas (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002; Kolenbrander et al., 2006). En este capítulo se demuestra la producción de señales tipo AHL en distintos tipos de muestra y diferentes bacterias orales, siendo la primera vez que se describe la producción de estas señales de QS en bacterias patógenas de la cavidad oral. Los resultados obtenidos sugieren que las AHLs podrían constituir un sistema común de coordinación dentro de la cavidad oral presentando una mayor importancia de la que se le ha atribuido hasta ahora.

Durante la última década se han utilizado numerosos biosensores basados en *E. coli*, *A. tumefaciens*, *C. violaceum* y *V. harveyi* para la detección de bacterias productoras de AHLs (Frias et al., 2002; Rai et al., 2015). Esta metodología presenta ciertas limitaciones ya que estas bacterias biosensoras suelen presentar una alta especificidad de forma que solo pueden detectar un número limitado de AHLs, En el caso de *V. harveyi* BB886, bacteria biosensora usada por Frias et al., (2002), esta solo detecta AHLs de cadena corta. Además, en estos cribados se suele obviar el efecto del medio de cultivo y las condiciones utilizadas, que pueden ser clave en la producción de moléculas tipo AHLs como se ha visto en trabajo anteriores (Mayer et al., 2018; Muras et al., 2018a; Girard et al., 2019) y no se suele tener en cuenta la posibilidad de que otras bacterias residentes de la cavidad oral produzcan las AHLs que puedan detectar los patógenos y aprovechar para activar sus factores de virulencia. Aunque el uso de bacterias biosensoras para la realización de cribados haya permitido hasta el momento la detección de cinco cepas capaces de producir AHLs, aisladas a partir de muestras superficie de la lengua, de la placa dental y de lesiones cariogénicas (Yin et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2013; Goh, 2014, 2016), que solamente se hayan encontrado estas pocas bacterias orales productoras de AHLs pertenecientes a los géneros *Enterobacter* sp., *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* (*Levinea*) y *Burkholderia*, pone de manifiesto la baja tasa de éxito que tiene esta metodología probablemente debido a su baja sensibilidad. Por ello, es necesario utilizar análisis de espectrometría de masas para una detección de AHLs irrefutable.

El análisis mediante HPLC de muestras de saliva y placa dental obtenidas de un paciente sano y un paciente periodontal mostró la presencia inequívoca de señales tipo AHLs en la cavidad bucal. Los resultados mostraron la presencia de la señal OC8-HSL en la saliva de ambos pacientes mientras que la señal C18-HSL solo fue identificada en el paciente periodontal. En cambio, el análisis de muestras de placa dental de los mismos individuos solo mostró la señal OC8-HSL en el paciente periodontal. La presencia de AHLs en muestras de saliva ha sido descrita previamente en pacientes sanos y pacientes con enfermedad gastrointestinal mediante un método basado en bioluminiscencia (Kumari et al., 2006; Struss et al., 2010) y mediante análisis cromatográfico (Kumari et al., 2008). Sin embargo, el uso de la biomuminiscencia no permite la identificación de las AHLs contenidas en las muestras y presenta también otras limitaciones ya que se ha descrito que la producción de luz en las bacterias se ve afectada por múltiples factores independientes de los sistemas de QS como pueden ser causas ambientales como son el pH o la disponibilidad de glucosa (DeKeersmaecker y Vanderleyden, 2003; Blair y

Doucette, 2013). En las muestras de saliva analizadas por Kumari et al., (2008) se observó una mayor diversidad de AHLs de hasta 8 tipos diferentes (desde C6 a C14-HSL) que podría deberse al análisis conjunto de mezclas de salivas de 2 individuos distintos y al mayor de volumen de muestras utilizado (7,2-14,25 mL). Además, debe tenerse en cuenta que estos estudios someten la saliva a centrifugación antes de su análisis (Kumari et al., 2006, 2008; Struss et al., 2010) por lo que es posible que se pierdan las AHLs de mayor longitud y de carácter más hidrofóbico contenidas en las micelas salivares.

El estudio del perfil de AHLs del paciente sano y del paciente periodontal durante cuatro semanas consecutivas puso de manifiesto la gran variabilidad de las AHLs presentes en las muestras de saliva de una misma persona a lo largo del tiempo, probablemente derivada de la alta viscosidad de las muestras. La señal HC4-HSL estuvo presente en varias muestras del paciente sano cuando este siguió su rutina habitual de higiene bucodental. En cambio, OC8-HSL se encontró solamente en la saliva obtenida cuando se solicitó al paciente sano que se abstuviera de lavarse los dientes al menos 12 h antes de la recogida de muestra. En cuanto a la saliva del paciente periodontal, únicamente se pudo identificar la presencia de C8-HSL en algunas de las muestras tomadas a lo largo del mes a pesar de que en experimentos previos se había logrado identificar también las señales OC8 y C18-HSL. Esto se podría deber a la ingestión de líquidos antes de la recogida de la muestra, lo que imposibilita la detección de las AHLs. La señal OC8-HSL en el estudio de Kumeri et al., (2008) fue la única AHL que estaba presente en las muestras de los pacientes con enfermedad gastrointestinal pero ausente en los sanos. A la vista de estos resultados, parece que existe la posibilidad de que la señal OC8-HSL sea característica de un ambiente potencialmente patógeno, aunque se necesitaría el estudio de un mayor número de muestras procedentes de diferentes tipos de donantes para demostrarlo. Además, se pone de manifiesto la necesidad de establecer unas pautas que deben de seguir los pacientes las horas previas a la recogida de muestra para intentar solventar la gran variabilidad de los resultados obtenida.

Se realizó el análisis de 12 muestras de saliva y de 12 piezas dentales obtenidas de los mismos pacientes para establecer una posible asociación entre el perfil de AHLs cuantificable en la cavidad oral y diferentes patologías orales bacterianas. Tanto en las muestras de saliva como en las de piezas dentales C8-HSL no solo fue la señal más abundante, sino que estuvo presente en todas las muestras estudiadas con una única excepción. Además, en las muestras de saliva se encontró C14 y C18-HSL como señales adicionales, las cuales solo estuvieron presentes en pacientes que se encontraban en medio de un proceso cariogénico. Esto apoya la posibilidad del uso de las AHLs como biomarcador para enfermedades orales bacterianas.

El aislamiento de 568 bacterias anaerobias, 287 cepas de placa dental y 280 cepas de saliva, obtenidas a partir de un paciente sano y de un paciente periodontal permitió la identificación de 62 posibles productoras de AHLs (10,91%) mediante la bacteria biosensora *A. tumefaciens* NTL4, aunque estos datos deben ser confirmados. Las placas de SCH sangre permitieron el aislamiento de una mayor proporción de bacterias productoras de AHLs en comparación con el medio Columbia en las cepas obtenidas del paciente sano, mientras que en el paciente periodontal se observa lo opuesto. En este caso, la menor cantidad de nutrientes, presente en el medio Columbia, no se puede correlacionar con una mayor actividad putativa de QS como se ha observado en otros estudios (Diggle et al., 2007; Muras et al., 2018a). Los resultados mostraron que la mayoría de las bacterias productoras de AHLs identificadas se aislaron del paciente sano (72,58%) y que estas están presentes en mayor proporción en las muestras de placa dental (8,75%-21,33%) que

en las de saliva (3,70%-8,96%), independientemente del estado de salud del paciente. No existen datos con los que comparar estos resultados del cribado de actividad de QS en bacterias de la boca pues, aunque existen algunos estudios previos donde se ha usado este procedimiento en cada uno de ellos solo se menciona un positivo, sin informar sobre el número de cepas cribadas ni el número total de positivos obtenidos (Yin et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2013; Goh et al., 2014, 2016). Aunque debe de tenerse en cuenta que la detección de este tipo de moléculas en estos cultivos no garantiza que las mismas se produzcan en la naturaleza, ya que se ha descrito el posible efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de AHLs (Mayer et al., 2018; Muras et al., 2018a; Girard et al., 2019), los resultados sugieren que los sistemas de QS mediados por AHLs podrían ser un sistema de coordinación más importante de lo considerado hasta el momento dentro de las comunidades bacterianas orales.

Este estudio es el primero en describir actividad QQ contra señales de cadena corta en bacterias aisladas de la cavidad bucal. Los resultados mostraron que un gran número de estas bacterias orales (14%-46,71%) son capaces de interferir con la señal C6-HSL, tanto las aisladas de muestras de saliva (28,14%-32,41%) como las procedentes de placa dental (14%-46,71%). Al contrario de lo observado para la detección de las moléculas de QS donde esta actividad es mucho más común en el paciente sano que en el paciente periodontal, la inhibición del QS fue más abundante en las muestras periodontales (37,42%) que en las muestras del paciente sano (23,20%) aunque presentaron valores bastante similares. Esta alta prevalencia de la actividad QQ en cepas orales (14%-46,71%) es mucho mayor que la descrita para muestras de suelo (2,5%) (Dong et al., 2002), siendo parecida a los valores obtenidos para muestras de diferentes ambientes marinos (Skindersoe et al., 2008; Romero et al., 2011, 2012; Weiland-Bräuer et al., 2015; Saurav et al., 2016; Torres et al., 2013, 2016) que presentan la mayor actividad QQ descrita hasta el momento. Curiosamente, 12 de las cepas presentaron doble actividad siendo capaces tanto de interferir con la señal C6-HSL como de activar el biosensor *A. tumefaciens* NTL4. El alto porcentaje de cepas cultivables con actividad QS dependiente de AHLs y QQ apoyó fuertemente la relevancia de esta actividad en la cavidad bucodental. Sin embargo, se necesitan más estudios que confirmen estos procesos relacionados con el QS y el QQ dentro de la cavidad oral y su potencial relevancia en el desarrollo de enfermedades bacterianas orales.

Durante el cribado con *A. tumefaciens* NTL4 se encontraron 73 cepas que inhiben el crecimiento de esta bacteria, siendo más abundantes en el paciente sano (60,27%) que en el paciente con enfermedad periodontal (39,72%). Dentro del paciente sano, las bacterias con actividad antibiótica fueron mucho más numerosas en la saliva (88,63%) que en la placa dental (11,36%). En cambio, en el paciente periodontal se encontraron valores similares para ambas muestras, 51,72% y 48,27% respectivamente. Esta mayor abundancia en el paciente sano de bacterias con actividad antibiótica capaces inhibir el crecimiento de los posibles patógenos orales, podría estar relacionada con el estado de salud del individuo. Recientemente se ha propuesto el uso como probiótico de una nueva bacteria oral, *Streptococcus dentisani* (Camelo-Castillo et al., 2014), que se encuentra presente en un alto porcentaje de pacientes sanos (98%) e inhibe el crecimiento de los principales patógenos orales debido a la producción de bacteriocinas y al tamponamiento del pH de la cavidad bucal (López-López et al., 2017).

El cultivo de biopelículas *in vitro* en BHI y BHI con sacarosa a partir de saliva de paciente sano permitió la identificación de hasta 9 tipos de AHLs de diferentes longitudes, siendo C4-HSL la señal más abundante (4,06-7,35 ng/mL). Sorprendentemente, los datos

obtenidos son muy similares, independientemente de si se añadió sacarosa o no al BHI y de si el cultivo se hizo en condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis. Solamente se encontraron diferencias respecto a la señal HC14-HSL que, aunque en muy pequeña cantidad (0,08 y 0,15 ng/mL), únicamente está presente cuando el medio de cultivo está suplementado con sacarosa, y la señal OC18-HSL (0,32 ng/mL) solo presente en BHI en aerobiosis. Estas pequeñas variaciones en la cantidad y número de AHLs presentes en las distintas muestras podría deberse a que la gran riqueza en nutrientes del medio de cultivo favorezca el rápido crecimiento de ciertas bacterias, como los *Streptococcus*, no siendo las condiciones de cultivo lo suficientemente diferentes como para que haya grandes cambios en la población bacteriana.

Por primera vez se ha conseguido detectar la presencia inequívoca de señales tipo AHLs, concretamente OC8-HSL, en biopelículas formadas por 6 patógenos orales (0,87 ng/mL) y en cultivos planctónicos de *P. gingivalis* (0,30 ng/mL), bacteria Gram-negativa considerada uno de los principales responsables del desarrollo de la enfermedad periodontal. Con el objetivo de determinar si *P. gingivalis* es la responsable de la producción de la señal OC8-HSL identificada en el cultivo mixto de patógenos, se realizaron mono- y co-cultivo con *S. gordonii* o *S. oralis*. Los datos mostraron que *P. gingivalis* en co-cultivo con *S. oralis* aumenta la cantidad de OC8-HSL (0,30 ng/mL a 1,40 ng/mL). A pesar de que estudios anteriores no habían logrado detectar la producción de AHLs en esta bacteria patógena (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002; Asahi et al., 2010), algunos trabajos habían intentado relacionar el papel de este tipo de señales de QS con el posible desarrollo de la enfermedad periodontal. Para ello, estudios previos han demostrado la capacidad de esta bacteria de cambiar su expresión proteica y su crecimiento como respuesta a la señal C14-HSL añadida exógenamente (Komiya-Ito et al., 2006) y se ha observado que la adición de moléculas análogas a las AHLs reduce la formación de biopelícula en esta bacteria (Asahi et al., 2010). La identificación y la cuantificación de las AHLs producidas por los patógenos podrían usarse como biomarcadores y para monitorizar el desarrollo de las enfermedades bacterianas (Kumari et al., 2006). Sin embargo, con los datos obtenidos en el presente estudio aún no se puede establecer una conexión entre la cantidad y el tipo de AHL identificada y la enfermedad periodontal.

El análisis de las secuencias de los 700 genomas orales y 137 metagenomas orales revelaron la presencia de alto número de genes relacionados con el QS y QQ mediado por AHLs, lo que apoya fuertemente la importancia de este tipo de actividades dentro de la cavidad oral. A pesar de la alta presencia de sintasas (97,81%) y receptores (99,27%) de AHL encontrada en los metagenomas analizados, la prevalencia de este tipo de receptores (0,18) fue claramente superior que la prevalencia de estas sintasas (0,03). Este desequilibrio entre las sintasas y los receptores de QS podría deberse a que algunas de estas bacterias Gram-positivas contenidas en los metagenomas no fuesen productoras de AHLs, pero pudieran detectarlas y responder ante las AHLs producidas por bacterias Gram-negativas. Es decir, esta diferencia entre las sintasas y los receptores de QS podría explicarse por la presencia de receptores LuxR huérfanos dentro de la población bacteriana, recientemente descritos en estudios previos (Case et al 2008; Muras et al., 2018a; Barriuso y Martinez, 2018). Estos datos apoyan la idea de que la habilidad de las bacterias para detectar las señales de QS producidas por otras bacterias es más eficiente que la capacidad de sintetizarlas ellas mismas dado que esto requiere de un alto coste de energía. Por ejemplo, se ha descrito que la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* responde de una manera específica y saturable a la señal OC12-HSL producida por *Pseudomonas aeruginosa* (Qazi et al., 2006). Incluso, se ha predicho que el gen *smu.46*

de la bacteria cariogénica *S. mutans* muestra una estructura similar a la familia LuxR, sugiriendo la existencia de un LuxR huérfano. Además, también se ha descrito la presencia de los genes *3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase* y *3-oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase* en cultivos planctónicos de *Streptococcus mutans* deficientes en LuxS (Wen et al., 2011).

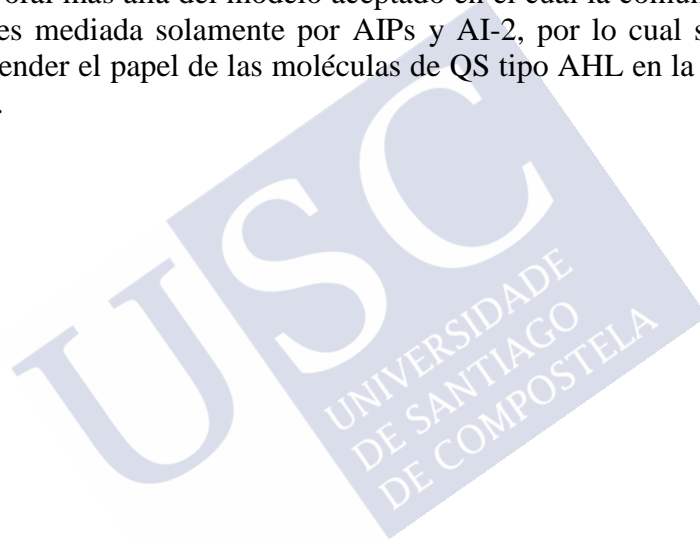
El análisis de los genomas y los metagenomas mostró la presencia de un mayor número de lactonasas en comparación con acilasas, perteneciendo la mayoría de ellas a la superfamilia de las metalo-beta-lactamasas (MBL). Esta mayor frecuencia podría explicarse a que estas proteínas son fácilmente identificables en las búsquedas genómicas y metagenomas debido a la presencia de características estructurales comunes dentro de la superfamilia como es la estructura terciaria ($\alpha\beta\beta\alpha$), el motivo conservado de unión al zinc y los dos residuos claves para la interacción con los metales iónicos responsables de la actividad catalítica (Murphy et al., 2003; Bebrone, 2007). Por lo tanto y a pesar de los datos obtenidos del análisis metagenómico confirman la prevalencia de actividades relacionados con el QS y el QQ dentro de la cavidad oral, estos resultados deben de interpretarse con precaución porque la identificación de secuencias similares no asegura la conservación de la funcionalidad o la expresión de estos genes bajos las condiciones específicas del medio. Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión génica de las biopelículas orales se ve influenciada por la presencia de patógenos orales (Frias-Lopez y Duran-Pinedo, 2012). Además, también es posible atribuir otras actividades bioquímicas a las enzimas de QQ por lo que esta alta presencia de genes implicados podría no estar relacionada inequívocamente con la degradación de AHLs.

El análisis de los 700 genomas orales analizados mostró una alta prevalencia del gen LuxS que se encontró en 309 de ellos, y una gran distribución al presentarse en 19 de los 34 géneros perteneciendo la mayoría a *Streptococcus* (22,65%), *Neisseria* (14,23%) y *Klebsiella* (13,59%). Los genes relacionados con los sistemas de QS mediados por AHLs, se identificaron en un número mucho menor de genomas. Se identificaron las sintasas LuxI (29 genomas), y HdtS (26 genomas) pero no AinS. Se observó la presencia de LuxR en 24 genomas diferentes, entre los que se incluyen los géneros *Burkholderia* (25%), *Enterobacter* (8,3%) y *Pseudomonas* (25%) pero sorprendentemente las bacterias Gram-positivas *Enterococcus* (16,6%) y *Lactobacillus* (25%). Además, se encontró el receptor huérfano QsdR-SdiA en 37 genomas de 4 géneros, mayormente *Klebsiella* (43,24%) y *Escherichia* (32,43%). En cuanto a las enzimas de QQ de tipo lactonasa se identificaron en un total de 47 genomas pertenecientes a 7 géneros distintos mientras que las acilasas solo estuvieron presentes en 23 genomas. Aunque se encontró un alto número de genomas de *Acinetobacter* con LuxI (34,48%) con los parámetros utilizados (e-value <10⁻⁵, longitud de alineamiento > 50% y similitud de la secuencia >50%) no se encontraron homólogos de LuxR. En este género también se encontraron secuencias de lactonasas lo que apoya lo descrito en estudios anteriores (Mayer et al., 2018). La búsqueda de genes relacionados con el QS mediado por AHL en *P. gingivalis* reveló la presencia de una posible sintasa similar a HdtS con un valor de identidad del 26%. Este bajo valor podría explicar el hecho de que este dato haya pasado desapercibido hasta el momento pues el análisis realizado sobre los 700 genomas no ha revelado esta secuencia putativa en ningún miembro del género *Porphyromonas*.

La presencia de secuencias de sintasas y receptors de AHL, así como secuencias de QQ están presentes en todas las muestras de genomas y metagenomas estudiadas, con una única excepción. Esto sugiere la importancia de los genes de QS y QQ, especialmente evidente en los metagenomas orales. Además, la prevalencia similar tanto de los procesos

de QS como de QQ mediados por AHL podrían sugerir una potencial relevancia de estos procesos en el mantenimiento del equilibrio ecológico de los habitantes microbianos de la cavidad oral a través de interacciones competitivas y cooperativas. Sería necesario un análisis más profundo para poder confirmar y completar nuestro conocimiento sobre el papel y relevancia de los procesos mediados por AHL en la cavidad oral.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran inequívocamente la producción de señales tipo AHLs por bacterias orales y sugieren que este tipo de moléculas de QS podrían tener un importante papel en el desarrollo de enfermedades infecciosas orales. Estos datos son especialmente importantes para una mayor comprensión de la enfermedad periodontal pues esta se encuentra dominada mayormente por bacterias Gram-negativas. En el caso de las biopelículas cariogénicas, aunque la placa dental está dominada por bacterias Gram-positivas no productoras de AHLs, no se puede descartar que las cepas productoras y sensibles a estas señales de QS jueguen un papel clave en la formación de biopelículas a pesar de que representan una minoría dentro de la comunidad de la biopelícula. Todas estas evidencias indican la existencia de sistemas de QS dentro de la biopelícula oral más allá del modelo aceptado en el cual la comunicación entre las bacterias orales es mediada solamente por AIPs y AI-2, por lo cual se necesitan más estudios para entender el papel de las moléculas de QS tipo AHL en la virulencia de los patógenos orales.



CAPÍTULO 4. EFECTO DE LA ADICIÓN DE ACIL-HOMOSERIN LACTONAS EN BIOPELÍCULAS ORALES

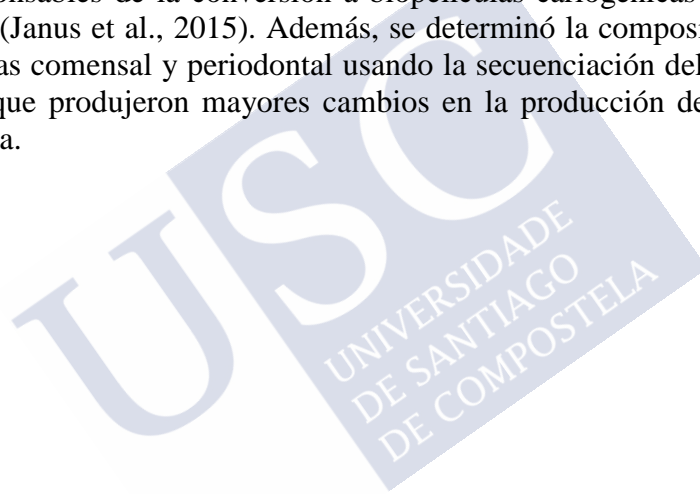
Antecedentes

La cavidad oral es un hábitat complejo formado por 500-1000 especies de microorganismos, siendo un alto porcentaje de estos incultivables (50%, Marsh et al., 2004) que colonizan dientes, lengua y mucosa oral. A día de hoy se sabe que el microbioma oral es responsable de las dos principales enfermedades orales: la caries dental, en la cual predominan especies cariogénicas, y la enfermedad periodontal que presenta una mayor proporción de bacterias anaerobias Gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis* (Marsh, 2003; Nishihara y Koseki, 2004; He y Shi, 2009; Simón-Soro y Mira, 2015). Además, algunas infecciones como la rinosinusitis, la diarrea o la vaginitis bacteriana se originan en la cavidad bucal (Simón-Soro y Mira, 2015).

Durante la formación de la placa dental, la saliva proporciona un amplio rango de moléculas complejas, como proteínas activas y glicoproteínas, que son absorbidas por la superficie de los dientes formando una película adquirida que conecta las piezas dentales con los colonizadores primarios (Marsh et al., 2016). Estos colonizadores primarios pueden coagregar entre ellos y con *Fusobacterium nucleatum*, pero son incapaces de hacerlo con los colonizadores secundarios. En cambio, *F. nucleatum* puede coagregar casi con cualquier bacteria oral por lo que se considera un componente clave de la placa dental (Kolenbrander et al., 2002, 2006, 2010). El equilibrio ecológico de los microbios de la boca, los cuales and co-evolucionado juntos y con su hospedador, se mantiene a través de una serie de interacciones colaborativas y competitivas. Por lo tanto, se cree que un desequilibrio en la microbiota oral producido por un cambio en las condiciones ambientales es lo que propicia la aparición de caries y la enfermedad periodontal (Marsh, 2003).

En la formación y maduración de la placa dental participan una amplia variedad de genes que influyen en las interacciones físicas y metabólicas que se producen entre los microorganismos, incluyendo genes relacionados con el *quorum sensing* (QS) (Benítez-Paez et al., 2014). Se han identificado diferentes genes de QS en patógenos orales Gram-positivos, como el péptido estimulador de la competencia (*competence-stimulating peptide*, CSP) presente en varios estreptococos orales, que está relacionado con la formación de biopelícula, pero también con la síntesis de bacteriocinas, la autólisis y la resistencia al estrés (Petersen et al., 2004; Senadheera y Cvitkovitch, 2008; Perry et al., 2009; Senadheera et al., 2009). LuxS, otro gen de QS, responsable de la producción de la señal de QS tipo AI-2 ha sido identificado en una gran cantidad de bacterias, incluyendo

numerosos patógenos orales como son *A. actinomycetemcomitans*, *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis* y *P. gingivalis* (Fong et al., 2001; Burgess et al., 2002; Merritt et al., 2003; McNab et al., 2003; Rickard et al., 2006). Además de la identificación los genes de QS, estudios previos también han demostrado la capacidad de diferentes bacterias orales de sintetizar las respectivas señales de QS (Fong et al., 2001; Burgess et al., 2002; Merritt et al., 2003; McNab et al., 2003, Petersen et al., 2004; Rickard et al., 2006; Yin et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2013; Goh, 2014, 2016) pero poco se conoce sobre su papel en la ecología microbiana oral en biopelícula multiespecie y su relevancia en el desarrollo de procesos patogénicos. Por ello, el objetivo de este capítulo es explorar el efecto de la comunicación mediada por AHLs en la patogenicidad de placa dental formada *in vitro*. Debido a que recientemente se ha demostrado la presencia de AHLs en bacterias de la cavidad oral (Capítulo 3) se decidió evaluar el efecto de este tipo de señales de QS sobre fenotipos microbianos correlacionados con las enfermedades orales como son la formación de lactato y la actividad proteolítica. Para ello se añadieron de forma exógena distintos tipos de AHLs en tres modelos clínicamente relevantes de biopelícula oral: comensal, cariogénico y periodontal (Janus et al., 2015). La capacidad para producir lactato y la actividad proteolítica se utilizaron como indicadores de desequilibrios bacterianos responsables de la conversión a biopelículas cariogénicas y periodontales, respectivamente (Janus et al., 2015). Además, se determinó la composición microbiana de las biopelículas comensal y periodontal usando la secuenciación del 16S ARNr para aquellas AHLs que produjeron mayores cambios en la producción de ácido láctico y actividad proteasa.



Resultados

1. Efecto de la adición de AHLs sobre la formación biopelícula oral

Se observaron pequeños cambios en la cantidad de UFCs/biopelícula cuando se añadieron AHLs al medio de cultivo en los tres tipos diferentes de biopelícula oral probados, pero en ningún caso las diferencias con el control fueron mayores de un orden de magnitud.

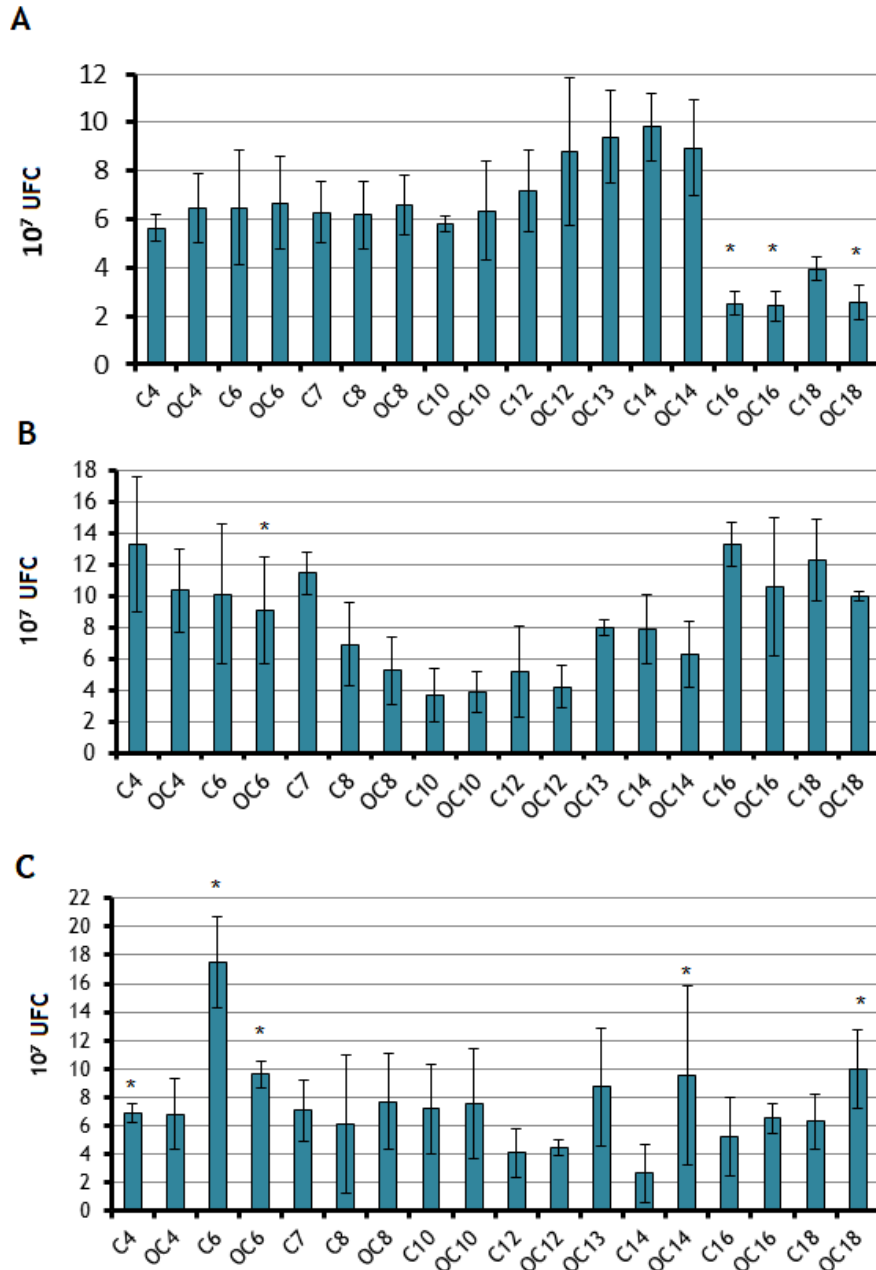


Figura 41. Efecto de las diferentes AHLs (1 μ M) en la formación de las biopelículas cariogénica (A), comensal (B) y periodontal (C) (UFCs/biopelícula). Los datos están representados como media \pm SD (n=4). Las diferencias significativas (Welch's t-test, $p < 0.05$) con los controles respectivos se marcaron con asteriscos.

De entre los 19 tipos de AHLs añadidos, la adición exógena de las moléculas de cadena larga C16, OC16 y OC18-HSL redujo significativamente la formación de biopelícula cariogénica obtenida en medio McBain con sacarosa después de 48 h de crecimiento:

2,58x 10⁸ UFC s, 2,4 x 10⁸ UFC s y 2,5 x 10⁸ UFC s respectivamente, frente a 4,28 x 10⁸ UFC s para el control (Figura 41A). Cuando se indujo la formación de biopelícula comensal obtenida en medio McBain, la señal OC6-HSL (9 x 10⁷ UFCs) redujo significativamente el número de UFCs en comparación con el control (1,2 x 10⁸ UFCs) (Figura 41B). Las biopelículas periodontales obtenidas en medio McBain con FCS fueron las más sensibles a la adición de AHLs, ya que se observó tanto un aumento como una disminución de las UFCs. De tal forma, las señales cortas C4, C6 y OC6-HSL junto con la señal de cadena muy larga OC18-HSL aumentaron la formación de biopelícula: 6,8x 10⁷ UFCs, 1,7 x 10⁸ UFCs, 9,6 x 10⁷ UFCs y 1,0 x 10⁸ UFCs respectivamente, frente a 5,3 x 10⁷ UFCs para el control (Figura 41C). Por el contrario, la molécula C14-HSL redujo claramente el número de UFCs: 2,63 x 10⁷ UFCs frente a 7,0 x 10⁷ UFCs para el control (Figura 41C).

2. Efecto de la adición de AHLs sobre la producción de ácido láctico

Las biopelículas cariogénicas mostraron los mayores niveles de producción de lactato (4,2-9,4 mM) en comparación con las biopelículas comensal y periodontal, las cuales tuvieron unos valores comprendidos entre 0,2 y 1,5 mM. Se observaron efectos importantes sobre la producción de ácido láctico cuando se añadieron AHLs en los diferentes tipos de biopelículas. Cuando se añadieron AHLs a biopelículas cariogénicas, las moléculas C8, OC8, C10, OC10, OC13, C14 y OC14-HSL redujeron claramente la formación de lactato (72,3%, 50,3%, 77,2%, 48,8%, 72,8%, 81,9% y 81,2 %) en comparación con el control (100%). Por el contrario, C12-HSL provocó un aumento (123,5%) del ácido láctico producido (Figura 42A). Estos efectos no se observaron en el caso de la biopelícula cariogénica, cuando la acumulación de lactato fue inferior a 7 mM (datos no mostrados). En el caso de la biopelículas comensal, la adición de C8-HSL mostró una reducción en la producción de ácido láctico (20,5%). También se observó un efecto inhibitorio de las moléculas de cadena larga desde OC13 hasta C18-HSL sobre la biopelícula comensal, 42,7% y 39,7% respectivamente. La biopelícula periodontal mostró la tendencia contraria ya que las AHLs de cadena larga aumentaron la acumulación del lactato y las cortas la redujeron. A pesar de esto, la señal C6-HSL produjo un aumento significativo del lactato en la biopelícula periodontal. Sorprendentemente, el suplemento del medio de cultivo con la señal OC18-HSL causó un gran aumento de la producción de ácido láctico tanto en la biopelícula comensal (256,9%) como en la periodontal (205,5%) (Figura 42B y C).

4. Efecto de la adición de AHLs en biopelículas orales

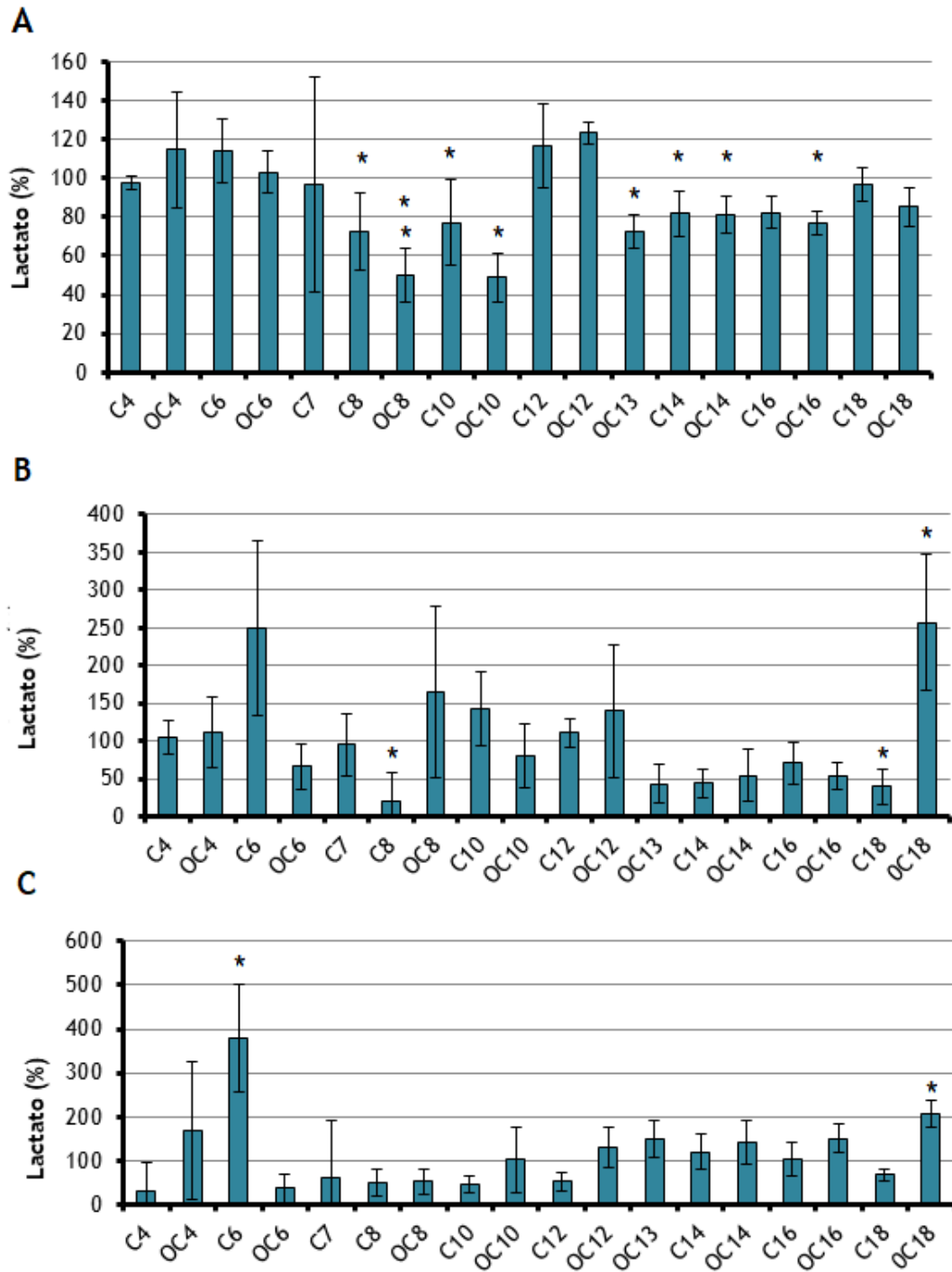


Figura 42. Efecto de las AHLs (1 μ M) en la acumulación de lactato (% en comparación con el control) en biopelícula cariogénica (A), comensal (B) y periodontal (C). El aumento de la acumulación de lactato observado al añadir la señal OC18-HSL en las biopelículas comensal y periodontal fue confirmado en un segundo experimento independiente. Los datos son representados como media \pm SD (n=4). Las diferencias significativas (Welch's t-test, $p < 0.05$) con los controles respectivos se marcaron con asteriscos.

3. Efecto de la adición de AHLs sobre la actividad proteasa

El efecto de las AHLs sobre la actividad proteasa solo se realizó en las biopelículas de tipo comensal y periodontal. Como era de esperar, la actividad proteasa fue mayor en la biopelícula periodontal con valores comprendidos entre $2,3 \times 10^7$ y $3,4 \times 10^7$ RFU/min en comparación con la biopelícula comensal (7×10^6 - $2,9 \times 10^7$ RFU/min). La adición de las señales OC6, OC13 y C18-HSL al medio de cultivo de la biopelícula comensal resultó en un claro aumento de la actividad proteolítica en comparación con el control (156%, 166,4% y 165,1% versus 100% para el control) (Figura 43A). Por el contrario, en la biopelícula periodontal la actividad proteasa se vio reducida por las señales OC6 y OC14-HSL (80% y 52,6 %) y aumentada por C10-HSL (138,8%) (Figura 43B).

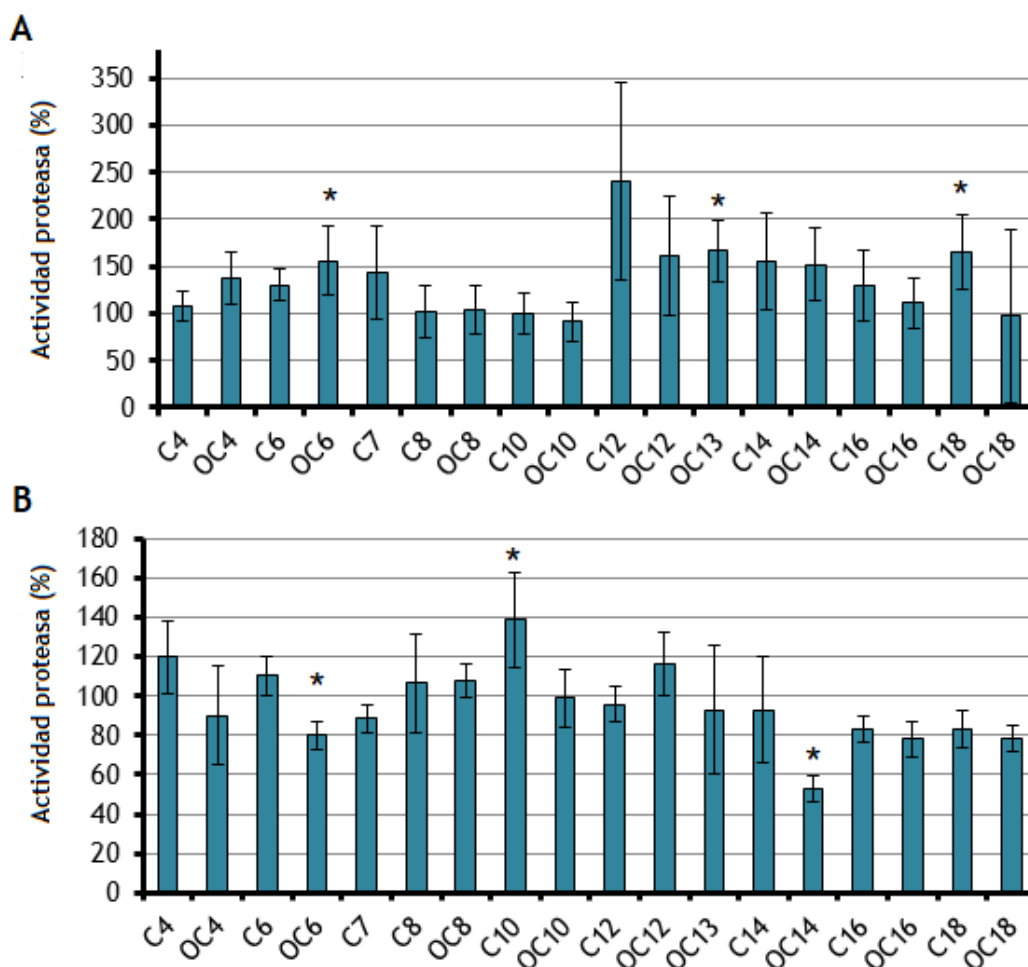


Figura 43. Efecto de la adición de las AHLs (1 µM) en la actividad proteasa con respecto al control (%) en biopelícula comensal (A) y periodontal (B). Los datos son representados como media ± SD (n=4). Las diferencias significativas (Welch's t-test, p<0.05) con los controles respectivos se marcaron con asteriscos.

4. Efecto de la adición de AHLs sobre la composición microbiana

Con el objetivo de explicar los efectos observados en los ensayos fenotípicos, se determinó la composición microbiana de las biopelículas comensal y periodontal cuando se añadieron las señales C6/OC6, C8/OC8 y C18/OC18-HSL usando la secuenciación 16S ARNr. Como era de esperar los controles de las biopelículas comensal y periodontal fueron significativamente diferentes (PERMANOVA, F=6,08, p=1e-04) (Figura 44). El

índice de diversidad de Shannon para la biopelícula periodontal fue mayor que para la biopelícula comensal (2,21 vs 2,38; $p=0,03$). El componente principal explica el 27,7% de la varianza diferenciando entre las biopelículas comensal y periodontal, que está representada mayormente por OTU5, OTU69 (especies de *Fusobacterium*) y OTU17 y OTU18 (*Prevotella* y *Alloprevotella*).

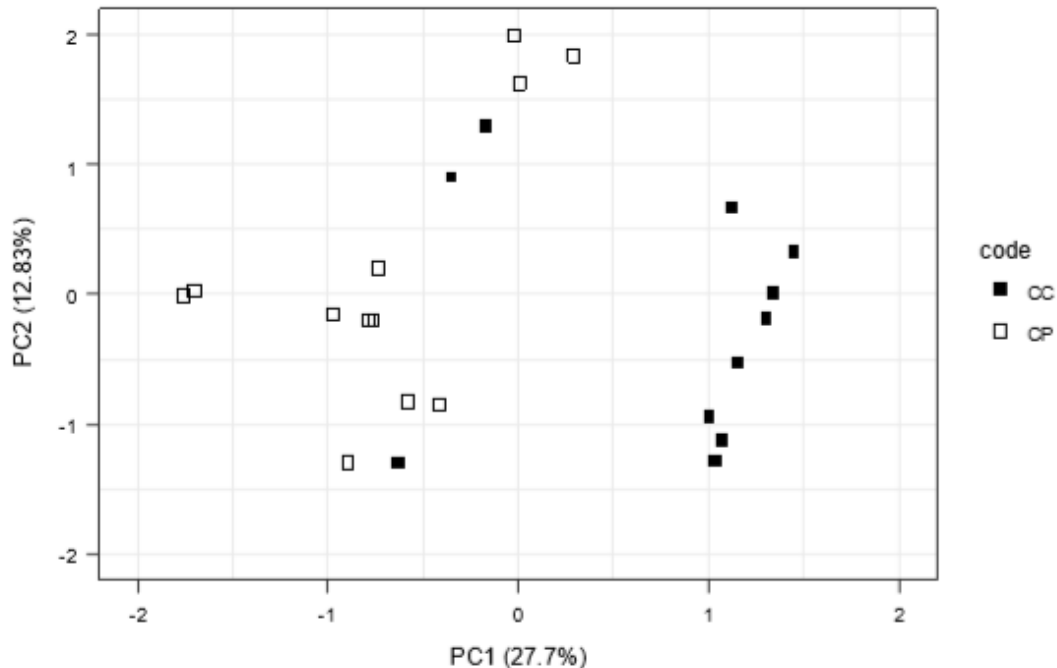


Figura 44. Comparación de la composición de especies en la biopelícula comensal (control comensal, CC) y periodontal (control periodontal, CP) con datos de 3 experimentos independientes realizados a lo largo de 3 semanas ($n = 12$). PC1 explica el 27,7% de la varianza, diferenciando las biopelículas comensales de las periodontales.

Se determinaron los efectos de las señales C6, OC6, C8, OC8, C18 y OC18-HSL en la composición microbiana de las biopelículas comensal y periodontal y compararon con sus respectivos controles dentro de cada experimento. Al añadir $1 \mu\text{M}$ de la AHL durante la formación de la biopelículas comensales, la composición de la comunidad no se vio modificada en comparación con sus controles respectivos (Figura 45A). Probablemente esto se deba a que los controles de uno de los tres experimentos independientes presentaron una composición bacteriana diferente. A pesar de esto, debe de tenerse en cuenta la modificación en la composición bacteriana causada por la adición de C6-HSL, que no está presente en ninguna de las otras AHLs añadidas en el mismo experimento: OC6, C7, C8 y OC8-HSL.

En cambio, en las biopelículas periodontales se observó un gran cambio en el eje PC1 al añadir C6-HSL, lo que explica el 31,37% de la varianza (Figura 45B).

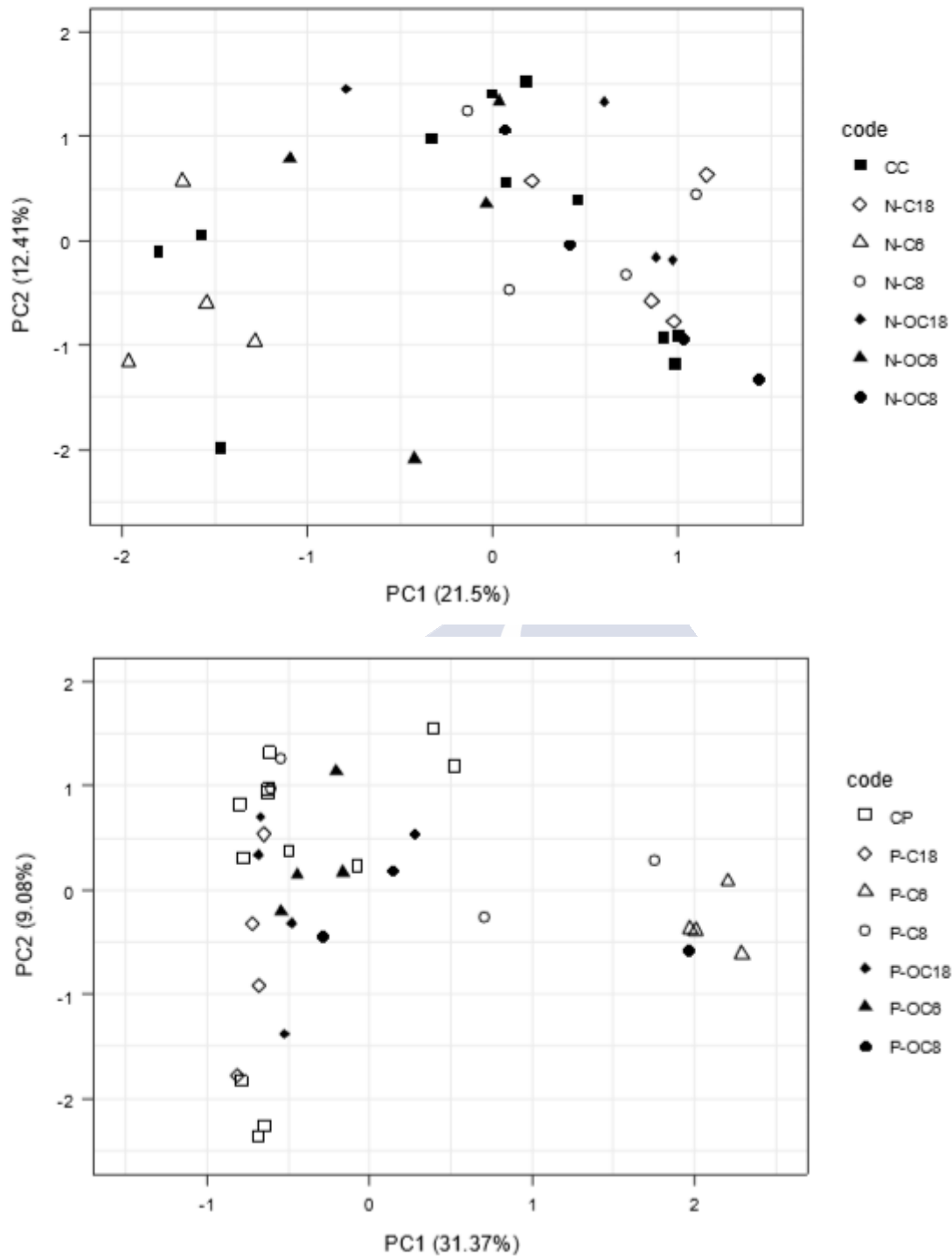


Figura 45. Efecto de la adición de la AHL exógena (1 μ M) en la composición de la biopelícula comensal (A) y periodontal (B). Los cuadrados representan los controles en ambos tipos de biopelícula (negro comensales, blancos periodontales). Los símbolos blancos representan las AHL mientras que los negros representan las variantes de las AHLs oxo-sustituidas. Triángulos = C6/OC-HSL, círculos = C8/OC8-HSL y diamantes = C18/OC18-HSL.

Cuando se comparó específicamente el efecto de C6-HSL con su variante oxo-sustituida OC6-HSL, se observó un claro y específico cambio inducido por la adición exógena únicamente de C6-HSL (Figura 46). La diferencia no fue significativa para las biopelículas comensales (datos no mostrados), sin embargo, si lo fue para las biopelículas

periodontales (PERMANOVA: $F=9,31$, $p=2e-04$). Se observó un cambio evidente a lo largo de PC1 (explica el 50,1% de la varianza), que está representado mayormente por una especie del género *Peptostreptococcus* (OTU9), *Alloprevotella* (OTU10) y *Prevotella* (OTU23) indicando que estas especies son las principales responsables de este cambio poblacional. Cabe destacar que estas especies diferencian también biopelículas comensales de las biopelículas crecidas en el modelo periodontal.

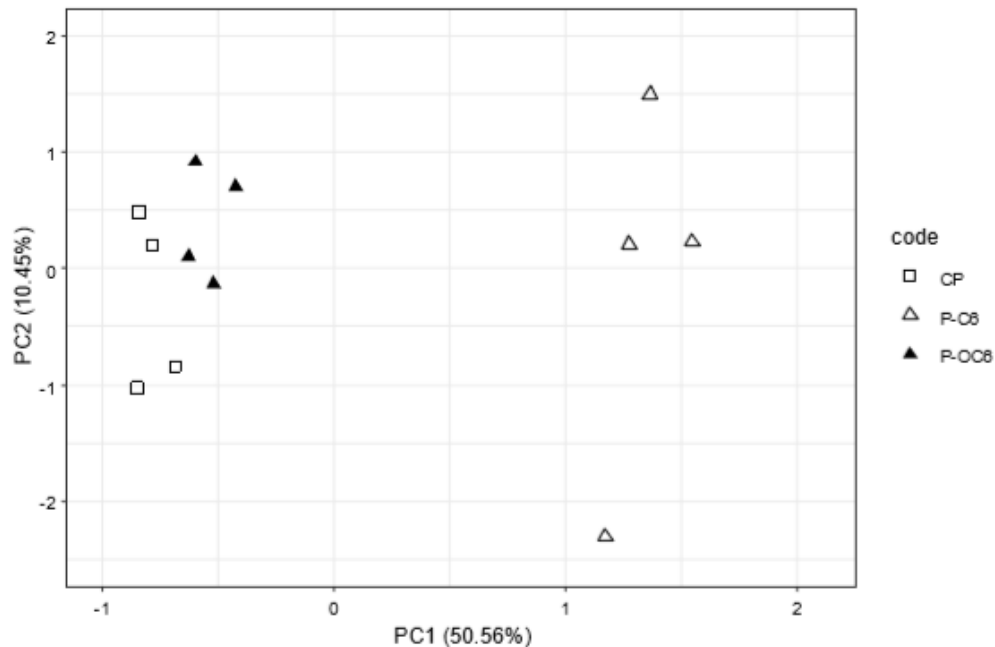


Figura 46. Comparación del efecto de la adición de C6 y OC6-HSL ($1 \mu\text{M}$) en la composición de las especies en las biopelículas periodontales. Se observa un claro cambio a lo largo de PC1 que explica el 50,6% de la varianza observada en las biopelículas periodontales. Los tres grupos son significativamente diferentes (PERMANOVA, $F=9,31$, $p=2e-04$).

Discusión

Dado que se sabe que la comunicación bacteriana tiene un papel esencial en la patogénesis microbiana al coordinar diversos comportamientos fisiológicos como la regulación de diferentes factores de virulencia dentro de las comunidades bacterianas orales entre las que se incluyen las biopelículas (Guo et al., 2014) y que estas confieren resistencia a las bacterias contra los agentes antimicrobianos (Donlan y Costerton, 2002), la descripción de factores clave que participen en la formación de biopelículas patogénicas podría permitir la identificación de nuevas dianas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

El posible papel del QS en la virulencia de los patógenos orales ha recibido poca atención e incluso menos atención se le ha dado al papel del QS en el establecimiento y mantenimiento de la ecología microbiana comensal en humanos (Ebersole et al., 2017). Debido a que recientemente se ha demostrado la presencia de AHLs en bacterias tanto comensales como patógenas de la cavidad oral (Capítulo 3) se decidió evaluar el efecto de AHLs añadidas de forma exógena sobre fenotipos microbianos bien correlacionados con las enfermedades orales, como son la formación de lactato y la actividad proteolítica en tres modelos diferentes de biopelículas: cariogénicas, comensales y periodontales (Janus et al., 2015).

A pesar de que el paradigma actual de la biopelícula oral excluye las señales de QS tipo AHLs, se observaron importantes cambios sobre la producción de ácido láctico y actividad proteasa cuando se añadieron estas señales al medio de cultivo. Aunque hubo diferencias significativas en el número de UFCs en los tres tipos de biopelícula oral probados, al ser estas diferencias en la formación de la placa dental menores de una orden de magnitud probablemente no resulten en un efecto observable clínicamente dentro de la cavidad oral (Janus et al., 2016). Los cambios en la formación de la biopelícula y de la actividad metabólica observados no parecen derivados de una inhibición del crecimiento de las bacterias, ya que se ha testado el efecto antimicrobiano de las AHLs sobre la bacteria *S. mutans*, y no se observó ninguna actividad inhibitoria (datos no mostrados). Esto apoyaría que los cambios generados por la adición de AHLs exógenas en la actividad de la biopelícula y la composición microbiana no se deben a un efecto antibiótico. Aunque se ha descrito la toxicidad de C12-HSL y del ácido tetrámico derivado de su degradación en bacterias Gram-positivas (Kaufmann et al. 2005) a concentraciones 10 veces mayores que la concentración usada en este trabajo, no se observó esta actividad inhibitoria de los derivados de las señales oxo-substituidas en los modelos de biopelícula oral.

El efecto observado de las AHLs fue mayor sobre las actividades metabólicas (producción lactato y actividad proteasa) que sobre el número de UFCs cuando se añadieron AHLs específicas a los tres modelos de biopelícula oral. Estos cambios en los fenotipos sin un gran efecto sobre el crecimiento bacteriano son típicos de un comportamiento controlado por los sistemas de QS. Por lo tanto, estos datos apoyan fuertemente la hipótesis de la importancia de las señales de QS tipo AHLs en la cavidad oral. El amplio rango de respuesta a la adición de estas señales, con biopelículas respondiendo de forma opuesta en función de las AHLs empleadas, aunque estas sean muy parecidas, podría deberse a la especificidad de algunos receptores de QS. Es bien sabido que mientras una AHL nativa puede activar un circuito de QS, una no nativa, aunque sea muy similar estructuralmente, puede actuar inhibiendo el mismo receptor (McClean et al., 1997; McLean et al., 2004).

Las moléculas C6, C8, C10 y C16-HSL (1 μ M), las cuales generaron cambios significativos en los modelos de biopelícula, han sido descritas previamente en bacterias aisladas de la cavidad oral (Yin et al., 2012b; Chen et al., 2013; Goh et al., 2014, 2016) pero ninguna de ellas es residente habitual de la boca ni patógeno oral. Por otro lado, las AHLs producidas por bacterias aisladas de la cavidad oral en estudios previos, principalmente C8-HSL y también C12-HSL (Yin et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2013), no tuvieron efecto. Curiosamente, dos cepas aisladas de pacientes con caries, *C. amalonaticus* and *Burkholderia*, presentaron un mayor rango de AHL producidas: C4, C6, C8 y C16-HSL, y C6, C8, C10 y C12-HSL respectivamente (Goh et al., 2014, 2016). La concentración de AHLs utilizada en el presente estudio (1 μ M) se encuentra dentro del rango de señales de QS producida por patógenos (Romero et al., 2014) y ha mostrado previamente efecto en los patógenos no productores de AHLs *E. coli* y *Salmonella enterica* (Bai y Rai, 2016). Además, C14-HSL causó una reducción en el número de UFCs en la biopelícula periodontal en el presente estudio (Figura 41). De un modo similar, un estudio previo observó que la señal C14-HSL no solo reducía el crecimiento bacteriano de *P. gingivalis* sino que también produjo cambios en la expresión proteica (Komiya-Ito et al., 2006), aunque en este caso la concentración utilizada fue cien veces mayor que la utilizada en el presente estudio. El uso de análogos de AHLs a concentraciones de 10 y 100 μ M también redujo la formación de biopelícula en *P. gingivalis* (Asahi et al., 2010). Un estudio reciente demostró el potencial uso de un análogo de C12-HSL para reducir el carácter cariogénica de la placa dental al reducir la presencia de *Streptococcus* spp. (54%) y aumentar la abundancia de *Actinobacillus* spp. (580%). Sin embargo, los autores

sugieren que estos cambios en la composición bacteriana no son debidos a la inhibición del QS al no haber competición entre el análogo y C12-HSL (Janus et al., 2016).

Los datos presentados aquí junto con otros estudios recientes sugieren que este tipo de señales de QS podrían tener un importante papel en el desarrollo de enfermedades infecciosas orales. En el caso de las biopelículas cariogénicas, aunque la placa dental está dominada por bacterias Gram-positivas no productoras de AHLs, no se puede descartar que las cepas productoras y sensibles a estas señales de QS jueguen un papel clave en la formación de biopelículas a pesar de que representan una minoría dentro de la comunidad de la biopelícula. Otra explicación sería que alguna de estas bacterias Gram-positivas no productoras de AHLs pudieran detectarlas y responder ante las AHLs producidas por las bacterias Gram-negativas. Por ejemplo, aunque *E. coli* no produce AHLs posee un homólogo de LuxR llamado SdiA que usa varias AHLs para activarse de forma que cuando no hay C8-HSL el receptor se encuentra de insoluble formando cuerpos de inclusión (Yao et al., 2006). Además, aunque las AHLs son consideradas típicas de bacterias Gram-negativas, se ha descrito la habilidad de bacterias Gram-positiva de producirlas (Biswa y Doble, 2013) y responder ante ellas (Qazi et al., 2006, Wen et al., 2011). En el genoma de *S. mutans*, el producto hipotético del gen *smu.46* muestra características de la familia de proteínas reguladoras, sugiriendo la existencia de un homólogo de LuxR (Wen et al., 2011). Adicionalmente, un estudio previo con *Staphylococcus aureus* ha demostrado la interacción de esta bacteria con la señal OC12-HSL producida por *Pseudomonas aeruginosa*, inhibiendo la producción de exotoxinas y favoreciendo la expresión de la proteína A (Qazi et al., 2006). Tampoco debería de descartarse la posibilidad de que exista alguna sintasa de AHL no identificada hasta el momento (Barriuso y Martínez, 2018). Nuestros resultados junto con todas estas evidencias indican la existencia de sistemas de QS mediados por AHLs dentro de la biopelícula oral más allá del modelo aceptado en el cual la comunicación entre las bacterias orales es mediada solamente por AIPs y AI-2.

A parte de controlar las actividades bacterianas y sus interacciones, los sistemas de QS tienen efectos tanto en interacciones simbióticas como patogénicas entre procariontas y eucariotas (Eberl y Tümmler, 2004; Holm y Vikström, 2014; Ebersole et al., 2017), por lo que la existencia de una comunicación entre bacteria y su hospedador usando moléculas bacterianas y hormonas del huésped debe ser tenida en cuenta (Hughes y Sperandio 2009). Por ejemplo, la mediación de la migración epitelial o la cura de heridas mediada por OC12-HSL se ha descrito en células humanas (Holm y Vikström, 2014). Se ha propuesto que bajas concentraciones de AHLs hacen menos eficiente a la respuesta inmune, pero por el contrario altas concentraciones lo exacerban (Hughes y Sperandio, 2009). Además, la bacteria *A. actinomycetemcomitans* necesita de la interacción del hierro y de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) producidas por el huésped con el sistema de dos componentes QseBC, que está asociado con el sistema de QS de AI-2, para estimular la formación de biopelícula (Weigel y Demuth, 2015). Por lo tanto, dada la posibilidad de que el hospedador regule la ecología oral microbiana al reconocer y responder a las moléculas de QS a las que está expuesto, sería necesario poder realizar estudios *in vivo* para comprender mejor estos sistemas tan complejos (Ebersole et al., 2017).

En el presente estudio, C6, OC6, C18 y OC18-HSL mostraron el mayor efecto sobre los fenotipos estudiados por lo que fueron las condiciones seleccionadas para realizar el análisis de la composición microbiana mediante la secuenciación por 16S ARNr. Los datos mostraron que la adición exógena de C6-HSL tiene la habilidad de cambiar la

composición microbiana de las biopelículas orales *in vitro*. Curiosamente, la señal OC6-HSL no induce este cambio en la composición. Esta especificidad de C6-HSL sugiere la existencia de una proteína de unión, posiblemente un receptor, que detectaría específicamente esta señal. C6-HSL aumenta la abundancia de *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus* y *Prevotella* en biopelículas periodontales, siendo los dos últimos miembros importantes del Complejo Naranja definido por Socransky (Socransky et al., 1998). Esto podría deberse a un efecto directo, por el aumento de la capacidad formadora de biopelículas de estas especies o alternativamente podría deberse a una reducción en la “fitness” de las bacterias que compiten o tienen un efecto antagonista con *Peptostreptococcus* y *Prevotella*. Sorprendentemente, el efecto de la adición de C6-HSL en la composición microbiana produjo un aumento de la producción de lactato tanto en las biopelículas comensales como en las periodontales. Por el contrario, no se observó un cambio significativo en la producción de actividad proteasa, indicando que este fenotipo no es lo suficientemente sensible para la detección de cambios importantes en la población. De esta forma, los resultados indican el potencial papel de las AHLs en el desarrollo de los desequilibrios bacterianos responsables del desarrollo de la enfermedad periodontal. De confirmarse este papel, las estrategias de QQ para prevenir la formación de biopelícula por patógenos orales constituirían una alternativa atractiva dado que esta aproximación no interfiere con el crecimiento bacteriano y, por lo tanto, las probabilidades de inducir resistencia o tolerancia son menores. A pesar de que los resultados obtenidos indican de forma sólida el papel de los procesos de QS en el desarrollo de la enfermedad oral, son necesario más estudios para entender el papel de las moléculas de QS tipo AHL en la virulencia de los patógenos orales para poder explorar una aplicación viable de estas estrategias en el campo de la salud bucodental.



CAPÍTULO 5. USO DE Aii20J PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE PLACA DENTAL

Antecedentes

Las biopelículas son comunidades microbianas extremadamente complejas que juegan un papel muy importante en la salud humana, siendo responsables de hasta el 80% de las infecciones bacterianas (Davies, 2003; Moreau-Marquis et al., 2008). La expresión fenotípica dentro de las biopelículas es diferente a la de la misma bacteria en estado planctónico, resultando en una mayor protección de los microorganismos frente a las defensas del hospedador durante la infección y una mayor tolerancia a los antibióticos (Walker y Sedlacek, 2007). Esto hace que el tratamiento de estas comunidades microbianas sea extremadamente complejo y tenga un gran impacto en la práctica clínica. Por ello, es necesaria la búsqueda y el desarrollo de nuevas sustancias antipatogénicas, que inhiban la virulencia bacteriana pero que no afecten al crecimiento de los microorganismos, reduciendo la aparición de resistencias.

La biopelícula oral es un tipo de biopelícula que se encuentra adherida principalmente a los dientes, pero también a la lengua y otras superficies mucosas de la boca. Está formada por una comunidad de microorganismos extremadamente diversa y variable, siendo un alto porcentaje de estos incultivables (50%, Marsh et al., 2004). A pesar de que la placa dental se encuentra también en individuos sanos, se considera uno de los principales factores para que se inicie un proceso infeccioso en la boca. Si no se trata a tiempo puede dar lugar a la aparición tanto de caries dental como de enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis). Durante las últimas décadas, los investigadores han desarrollado diferentes métodos para el estudio de las biopelículas utilizando distintos modelos *in vitro* (McBain, 2009; Sánchez et al., 2011; Maske et al., 2017) lo que ha permitido grandes avances en cuanto a la comprensión de los mecanismos moleculares de su formación y su relación con las patologías orales.

El QS juega un papel clave en la expresión de factores de virulencia como la formación de biopelículas por lo que el bloqueo de la comunicación bacteriana, proceso conocido como *quorum quenching* (QQ) ha sido propuesto como una alternativa al tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas (Romero et al., 2015). Dado que las estrategias del QQ no interfieren directamente con la habilidad de los microorganismos para crecer y reproducirse, la probabilidad de inducir tolerancia contra este tipo de mecanismos es menor que con los antibióticos (García-Contreras et al., 2016; Guendouze et al., 2017). Multitud de estudios ya han demostrado la viabilidad de las aplicaciones biotecnológicas del QQ en diferentes áreas que van desde la biomedicina hasta la acuicultura pasando por la agricultura (Romero et al., 2015; Grandclément et al. 2016; Rémy et al., 2018) entre

las que también se incluye el control de diferentes tipos de biopelícula (Yeon et al., 2009; Kim et al., 2011; Oh et al., 2012; Lade et al., 2014, Ivanova et al., 2015, Muras et al., 2018b; Soler et al., 2018). La lactonasa Aii20J (Mayer et al., 2015) es capaz de reducir la formación de biopelícula en la importante bacteria nosocomial *Acinetobacter baumannii* ATCC17978 y en diferentes aislados clínicos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (López et al., 2017; Mayer, 2018). La inmovilización de la enzima SsoPox en membranas de nanoaluminio redujo los factores de virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, demostrando el potencial uso de estas enzimas de QQ en dispositivos médicos (Ng et al., 2011). También se ha probado el uso combinado de una acilasa de QQ y una α -amilasa retenidas en un catéter urinario. Los resultados mostraron que esta combinación fue capaz de reducir la formación de biopelícula en un modelo animal hasta 7 días (Ivanova et al., 2015). Sin embargo, pocos trabajos han explorado su aplicabilidad para la prevención de la biopelícula oral (Muras et al, 2018b).

Debido a que la reciente confirmación de la importancia de las señales que participan en los sistemas de QS en la cavidad oral y su posible papel en la patogenicidad de la placa dental (Capítulos 3 y 4) abre nuevas perspectivas en la prevención y/o en el tratamiento de las enfermedades orales bacterianas al estar disponibles enzimas de elevada actividad frente a estas señales (Mayer et al., 2015, 2018). En el presente capítulo se utilizó el equipo xCELLigence® System RTCA (ACEA, Biosciences Inc.) (Junka et al., 2010; Cihalova et al., 2015; Ferrer et al., 2016, Gutiérrez et al., 2016; Muras et al., 2018b) y una modificación del modelo de adhesión activa *Active Attachment Amsterdam model* (modelo AAA) (Exterkate et al., 2010) para obtener diferentes tipos de biopelícula orales (Janus et al., 2015) con los que comprobar la viabilidad de la aplicación de enzimas de QQ para la prevención y/o el tratamiento de la placa dental. Con el objetivo de comprender mejor el posible mecanismo de acción de la enzima de QQ Aii20J sobre biopelícula oral también se determinó su efecto sobre la composición bacteriana mediante análisis del 16S ARNr mediante técnicas de secuenciación masiva.

Resultados

1. Formación de biopelícula en el sistema xCELLigence®

Una vez se ha confirmado la presencia de AHLs en bacterias de la boca, muestras de saliva y placa dental, se decidió probar el efecto de compuestos con actividad QQ sobre estas señales y la formación de biopelícula oral. Con el objetivo de determinar si la inhibición de la biopelícula oral causada por el extracto PCE20J observada sobre la primera de las biopelículas obtenida a partir de saliva de un paciente sano (Capítulo 2) procede de la lactonasa Aii20J contenida en este extracto (Mayer et al., 2015), se utilizó dicha enzima purificada. En este nuevo experimento, realizado con una saliva obtenida de otro paciente sano se observó una importante reducción en la biopelícula al añadir la enzima de QQ Aii20J. Esta inhibición fue independiente de que el medio de cultivo utilizado tuviera o no sacarosa (Figura 47), indicando la viabilidad del uso del compuesto QQ para prevenir la formación de biopelícula al menos en determinadas condiciones. Sorprendentemente, aunque la inhibición fue similar en ambos cultivos se observó una actividad ligeramente mayor en BHI suplementado con sacarosa (85,87%), con respecto al BHI (79,47%), muestra que debería presentar mayoritariamente miembros del género *Streptococcus*. En vista de los resultados obtenidos se decidió usar la saliva de este donante para los siguientes experimentos llevados a cabo con el equipo xCELLigence®.

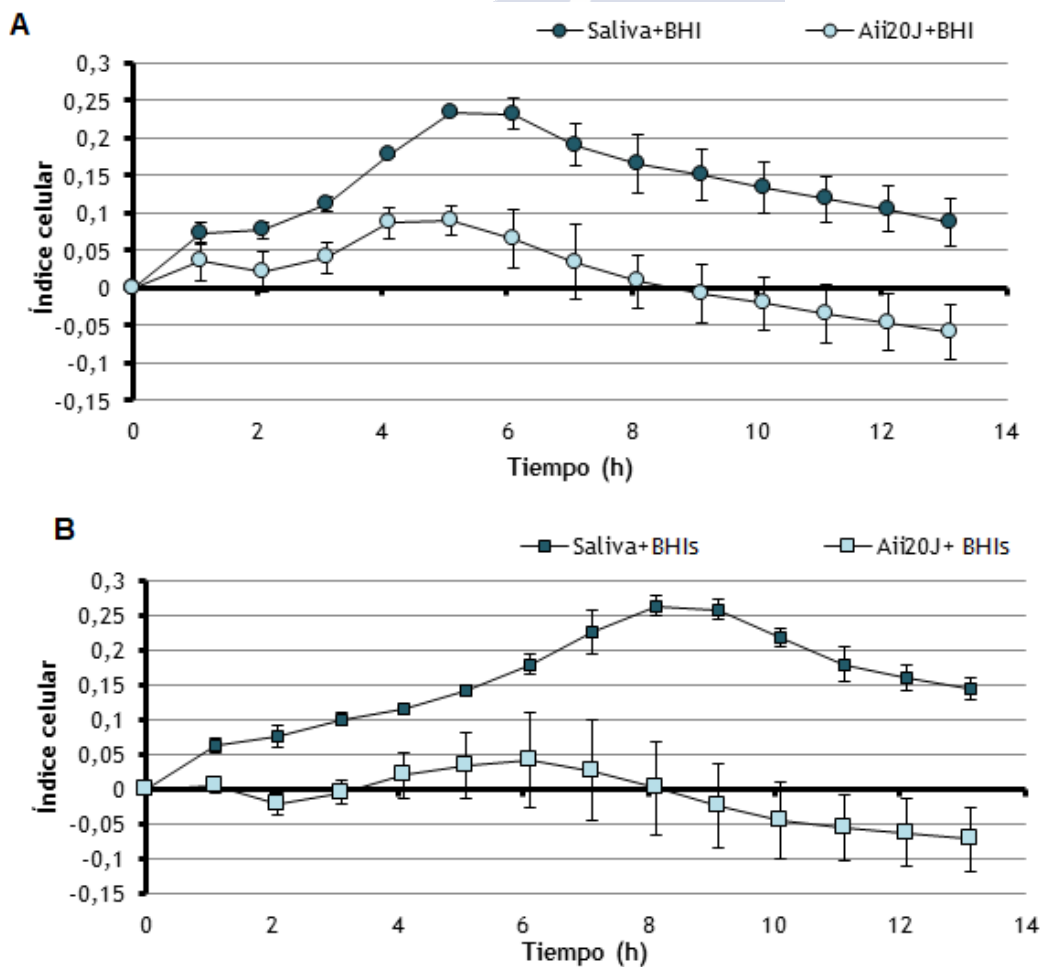


Figura 47. Cuantificación y efecto de Aii20J (20 µg/mL) en la biopelícula oral formada a partir de la saliva de un donante sano medida por el equipo xCELLigence®. El cultivo se realizó en BHI (A) y BHI suplementado con sacarosa al 0,1% (B). La formación de la biopelícula está expresada como índice celular (n=3).

1.1 Optimización del inóculo y del medio de cultivo

Comprobada la capacidad de Aii20J para reducir la formación de biopelícula oral, al menos en este donante y en estas condiciones, y la capacidad del equipo xCELLigence® para detectar dicha inhibición, se decidió buscar las condiciones más idóneas para la caracterización de la actividad contra la biopelícula oral. Con el objetivo de optimizar el inóculo y el medio de cultivo se probó como medio de cultivo saliva humana estéril y como inóculo bacterias orales concentradas obtenidas del mismo donante sano mediante centrifugación. En este experimento se obtuvo una buena formación de biopelícula oral cuando se utilizó BHI como medio de cultivo, independientemente de que el inóculo utilizado fueran bacterias orales (Figura 48A) o saliva (Figura 48B). En ambos casos, la adición de Aii20J mostró una importante inhibición de la biopelícula, que fue mayor cuando se usó saliva como inóculo.

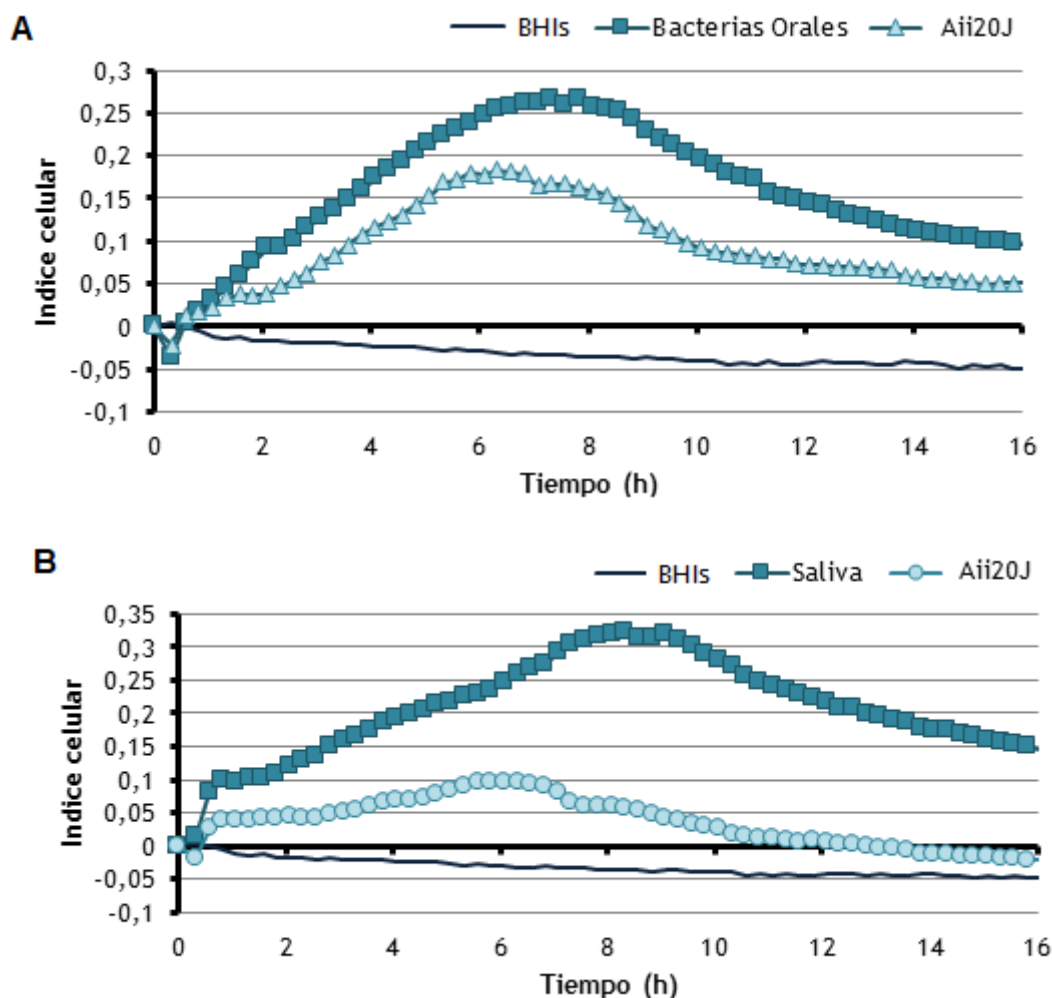


Figura 48. Formación de la biopelícula oral y efecto de Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio BHI con sacarosa (0,1%) cuando se inocula con bacterias orales (A) o saliva (B) (n=3).

El uso de saliva estéril como medio de cultivo no permitió la formación de una biopelícula cuantificable por el equipo xCELLigence® (Figura 49), independientemente de que se usaran bacterias orales o saliva como inóculo.

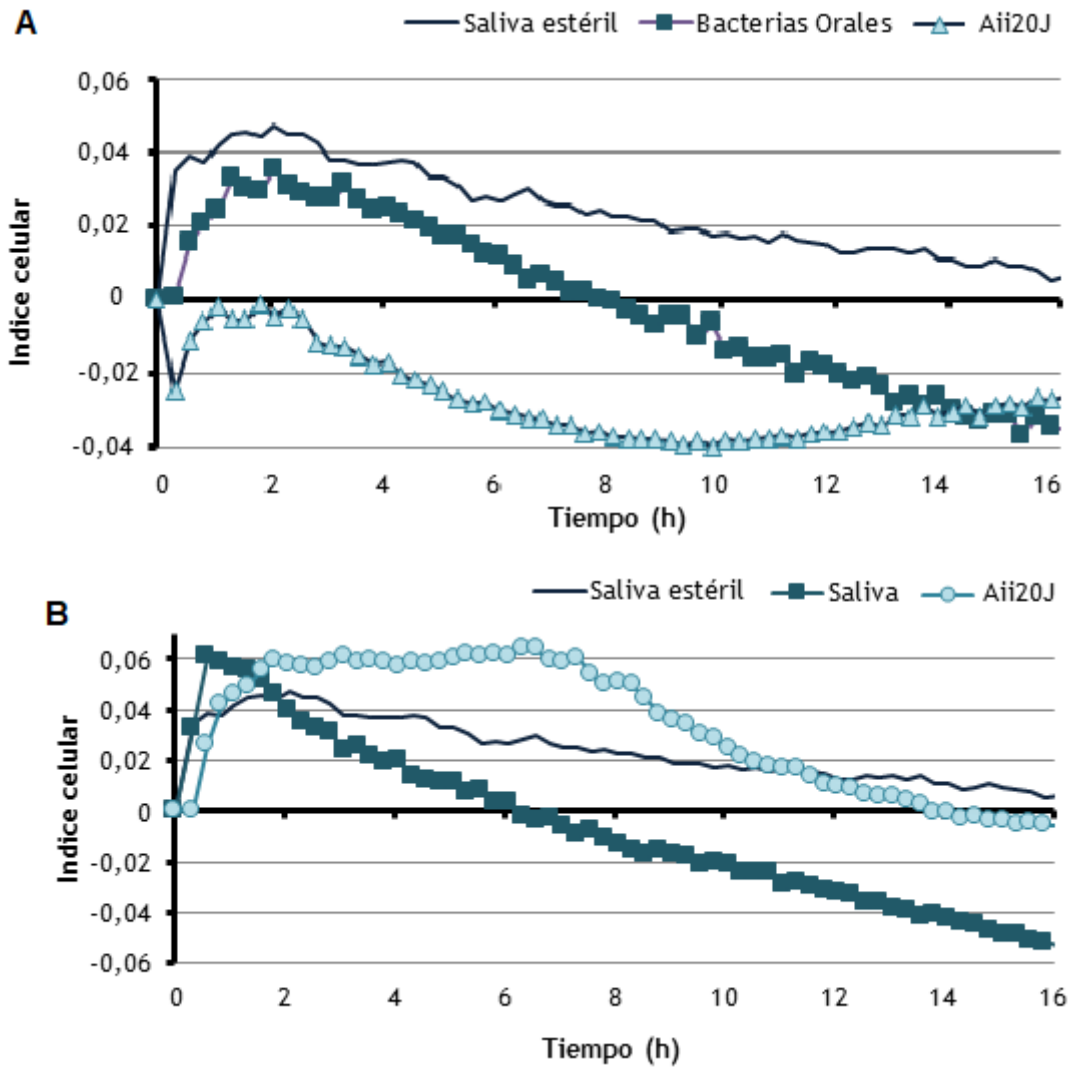


Figura 49. Comparación de la formación de la biopelícula y efecto de Aii20J (20 µg/mL) en saliva estéril cuando se inocula con bacterias orales (A) o saliva (B) (n=3).

Se decidió utilizar también placa dental como posible inóculo utilizando el medio BHI-2, que presenta una mayor carga nutritiva. Se probó en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, que se consiguió al añadir unas gotas de parafina líquida en cada pocillo. En ambos casos, la adición de Aii20J mostró una clara inhibición en estas condiciones observándose una reducción en la formación de la biopelícula oral del 30,22% en aerobiosis y del 31,25% en anaerobiosis (Figura 50). Sin embargo, se descartó el uso de estas condiciones para el cultivo de biopelícula oral dado el bajo índice celular obtenido con la tecnología xCELLigence®.

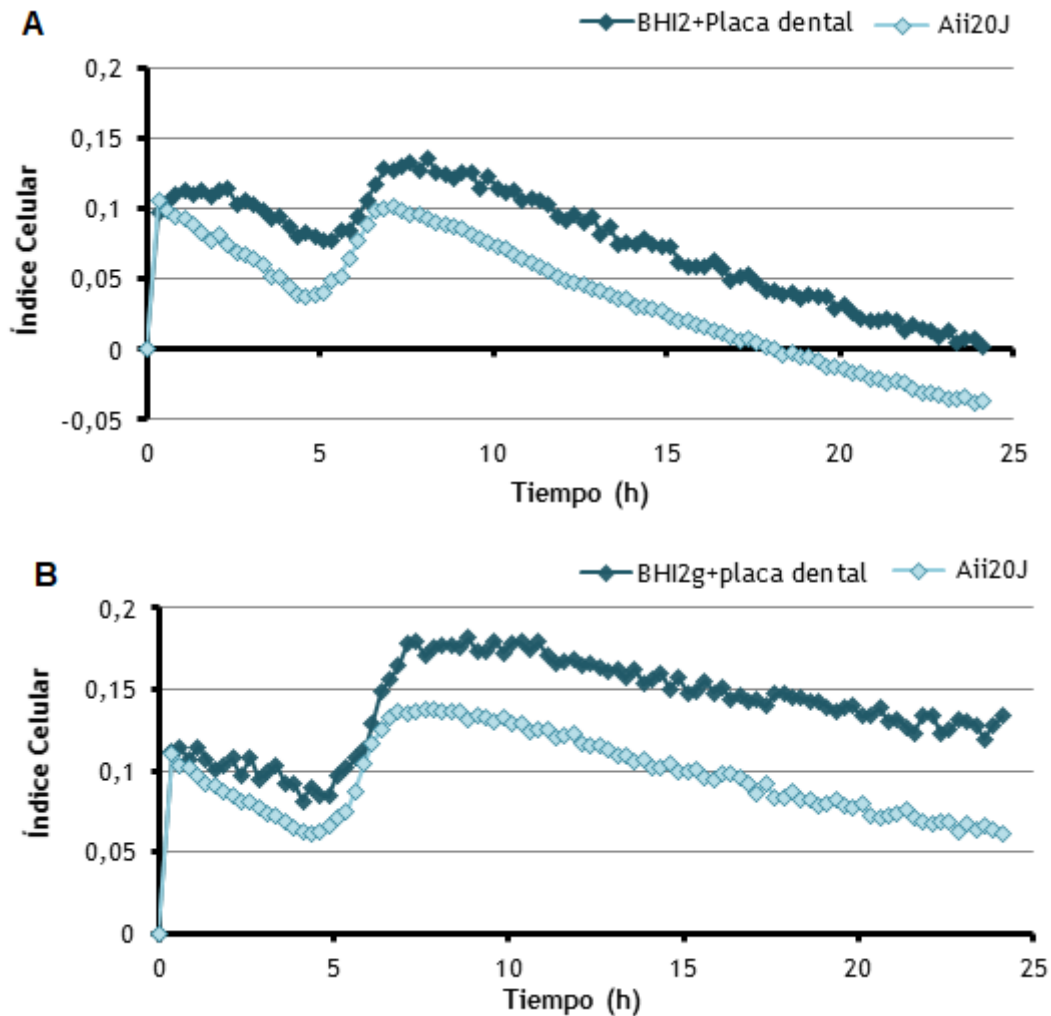


Figura 50. Comparación de la formación de la biopelícula y efecto de Aii20J (20 µg/mL) en el medio BHI-2 cuando se inocula con placa dental en condiciones de aerobiosis (A) o anaerobiosis (B) (n = 3).

El último tipo de inóculo empleado fue una muestra subgingival obtenida mediante cureta que permitió la formación de biopelícula en el equipo xCELLigence® (Figura 51). La adición de la enzima Aii20J mostró una reducción en la adherencia bacteriana tanto en condiciones de aerobiosis (Figura 51A) como en anaerobiosis (Figura 51B), condición nuevamente conseguida mediante la adición de parafina líquida. La actividad inhibitoria de Aii20J al añadirse al medio de cultivo fue mayor tras 24 h de incubación (68,75%-69,78%) que después de las primeras 8 h (81,43%-82,39%).

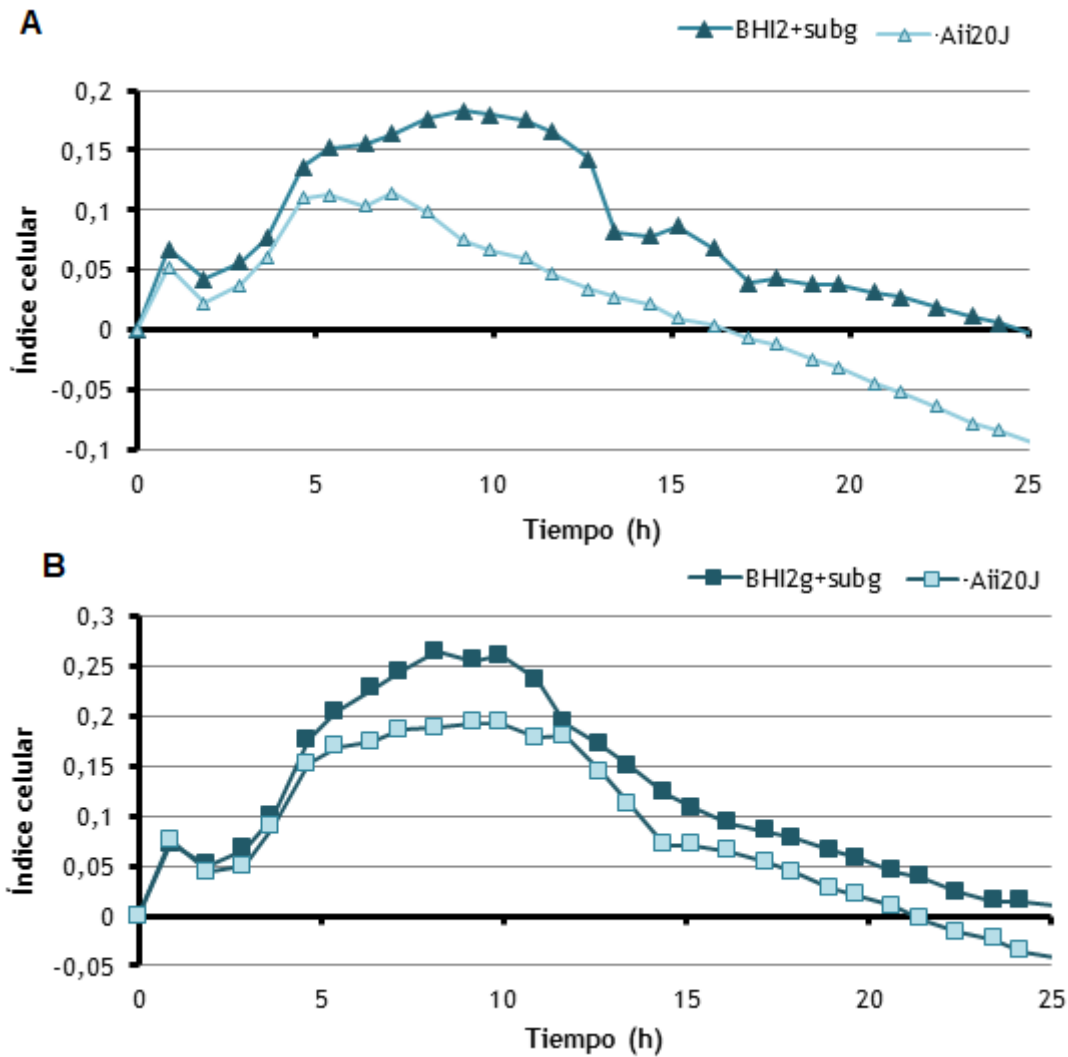


Figura 51. Comparación de la formación de la biopelícula y efecto de Aii20J (20 µg/mL) en el medio BHI-2 cuando se inocula con muestra subgingival en condiciones de aerobiosis (A) o anaerobiosis (B).

Como el uso de la saliva como inóculo permitió tanto la mayor formación de biopelícula como el mayor efecto inhibitorio de la enzima sobre esta, se seleccionó este tipo de muestra para el resto del trabajo. De igual forma, se escogieron los medios BHI y BHI suplementado con sacarosa para los siguientes experimentos.

1.2 Efecto de Aii20J sobre distintos tipos de salivas clínicas

Con el objetivo de determinar la viabilidad del uso de Aii20J como compuesto para prevenir o tratar enfermedades bucodentales bacterianas, se probó su efecto sobre diferentes pacientes para ver si el efecto observado en el paciente sano inicial es un caso aislado. Cuando se probó el efecto de Aii20J sobre diferentes muestras clínicas se observó una importante inhibición de todas las biopelículas medidas con el sistema xCELLigence® con la única excepción de la muestra M6 cuando esta se cultivó en BHI suplementado con sacarosa (Figura 52). Probablemente esta muestra M6 no mostró sensibilidad al efecto de Aii20J por el bajo índice celular (0,1) alcanzado por esta biopelícula al cultivarse en BHI sin sacarosa en el equipo de cuantificación. La enzima Aii20J mostró una inhibición de al menos un 75% de la biopelícula obtenida a partir de pacientes sanos (M0 y M1). En cambio, en las muestras de pacientes con diferentes

estados de enfermedad periodontal los datos presentaron una mayor variabilidad. En los pacientes con enfermedad periodontal avanzada el uso de la enzima presenta una menor formación de biopelícula en el medio BHI (18,41%-44,35%) que cuando el medio se suplementa con sacarosa (39,64%-137,94%). En cambio, en los pacientes con enfermedad periodontal moderada durante la adición de la enzima Aii20J se observa el efecto contrario, la formación de biopelícula es menor cuando esta se cultiva en presencia de sacarosa (14,06%-43,88%) que cuando este azúcar no se incluye en el medio (58,32%-59,53%). Esta diferencia en la efectividad de la enzima Aii20J en función del tipo de muestra periodontal y del medio de cultivo utilizado podría sugerir importantes diferencias en la composición de las poblaciones microbianas presentes en los distintos grados de la enfermedad periodontal.

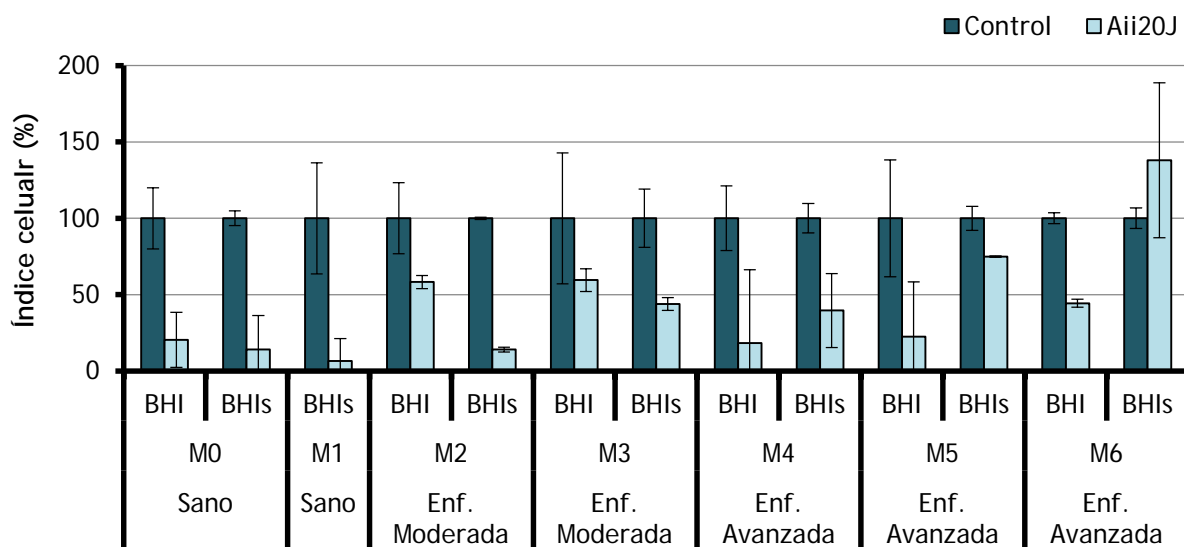


Figura 52. Efecto de Aii20J (20 µg/mL) sobre la formación de biopelícula a partir de muestras de saliva de pacientes sanos (M0 y M1) y con patologías orales (M2-M6) o en medio de cultivo BHI o BHI suplementado con 0,1% de sacarosa medida en el xCELLigence®. La formación de las biopelículas incubadas 8 h está expresada en porcentaje (n=2).

1.3 Comparación de la inhibición de Aii20J con la actividad de colutorios bucales comerciales

Para realizar la comparación entre un posible tratamiento alternativo con Aii20J y las terapias utilizadas actualmente se seleccionaron los enjuagues bucales comerciales GingiLacer (0,15% de triclosán) y Bexident Post (0,2% de clorhexidina). El triclosán es un agente antibacteriano y fungicida que se encuentra en muchos productos como agente desinfectante. Por su parte, la clorhexidina (CHX) es un antiséptico de acción bactericida y fungicida ampliamente empleado en odontología como ingrediente en colutorios. El colutorio GingiLacer se diluyó (15 µg/mL) para obtener una concentración similar a la utilizada de Aii20J (20 µg/mL). En el caso del colutorio Bexident algunos de los componentes interferían con la medida del equipo xCELLigence® por fue necesario utilizar una dilución mayor de dicho enjuague (CHX, 2 µg/mL). Estas concentraciones de los colutorios comerciales probadas en el xCELLigence® son 33 veces más pequeñas que las que teóricamente deben tener estos enjuagues cuando se usan en boca, aunque el tiempo de exposición es mucho más corto.

La adición de la enzima Aii20J mostró una reducción significativa (test t de Student, $p > 0,05$) en la formación de biopelícula oral tanto a las 8 h de incubación (36,17%) como a las 24 h (27,49%) (Figura 53). Efecto también significativo fue el obtenido con el enjuague bucal Bexident Post (22,97%-36,87%) sobre la biopelícula (test t de Student, $p < 0,05$). En cambio, GingiLacer (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solo consiguió reducir un 20% la formación de biopelícula a las 8 h de incubación. Estos resultados son muy prometedores pues la adición de un compuesto inhibidor del QS como es Aii20J es capaz de generar unos resultados muy similares a los obtenidos con un compuesto antiséptico de acción bactericida y fungicida ampliamente utilizado como es la CHX.

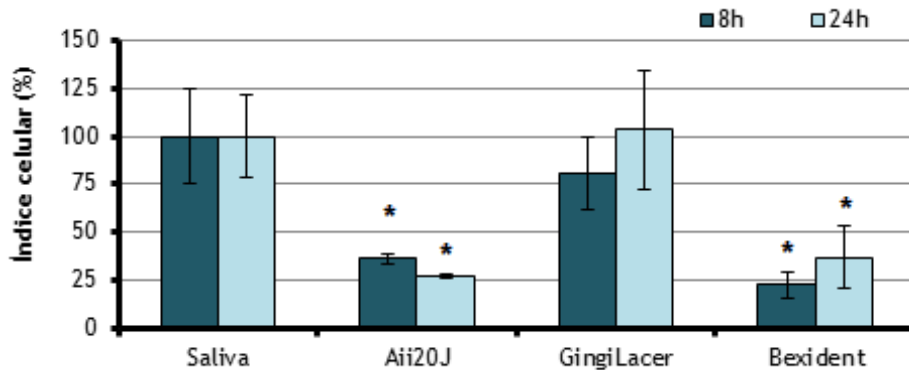


Figura 53. Comparación de la formación de la formación de biopelícula oral en presencia de Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), GingiLacer (triclosan 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Bexident (clorhexidina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) medida por el equipo xCELLigence® en el medio de cultivo BHI. Los datos son representados como media \pm SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, $p < 0,05$) con el control se marcaron con asteriscos.

Con el objetivo de determinar de la posible aplicación de la enzima Aii20J en salud bucodental mediante su administración en enjuagues comerciales, se comprobó la estabilidad de la actividad lactonasa en dos formulaciones suministrados por la empresa DENTAID. Los bioensayos realizados para comprobar si Aii20J mantenía la actividad QQ en los enjuagues demostraron la estabilidad de la lactonasa en ambos productos al menos durante 2 años cuando estos se almacenan a 22°C (Figura 54). Incluso, a pesar de almacenar las formulaciones a 40°C la enzima mantuvo su actividad lactonasa en el enjuague azul durante 6 meses.

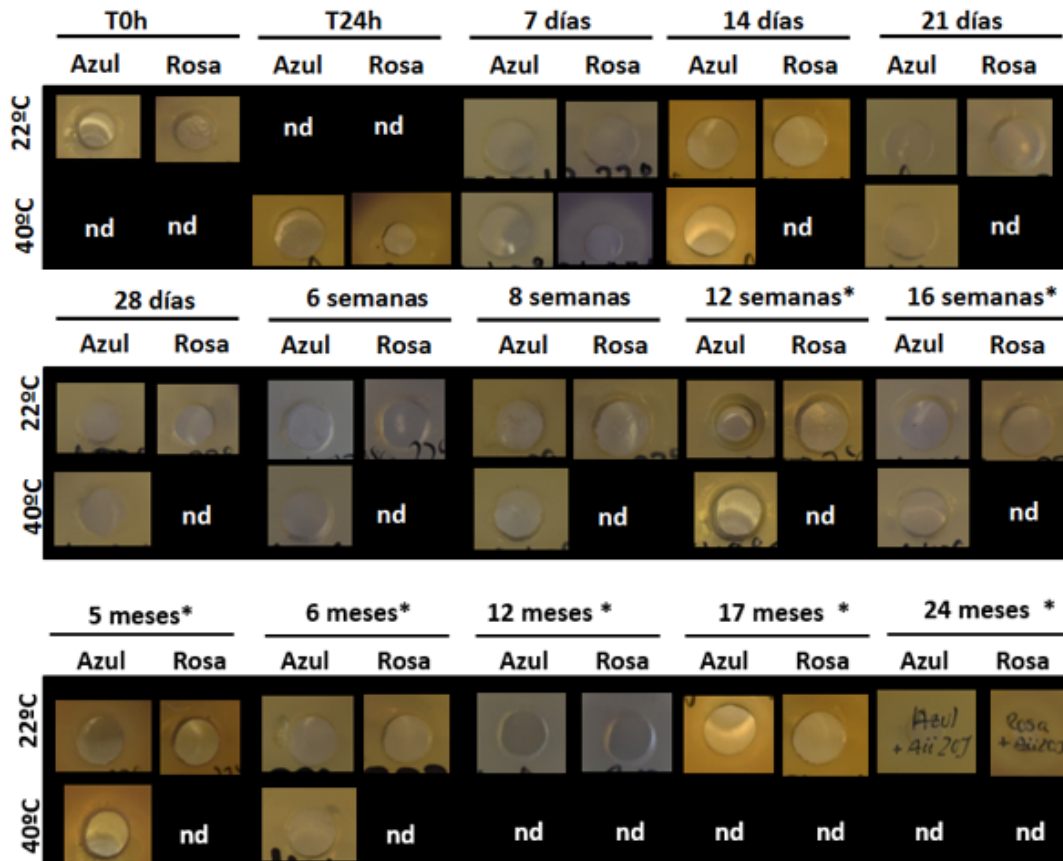


Figura 54. Comprobación de la estabilidad de la actividad lactonasa de la enzima Aii20J (20 ug/mL) a diferentes tiempos contenido en dos enjuagues suministrados por la empresa DENTAID: azul y rosa, los cuales se almacenaron a 22° y 40°C. Las muestras de los colutorios con la enzima se incubaron 24 h con la molécula señal C6-HSL (2µg/mL) (n. d.= no determinado) antes de la realización del bioensayo. * Incubación de 3 horas con la molécula C6-HSL.

2. Formación de biopelícula en el sistema adherencia activa

Después del uso del modelo AAA en las instalaciones del *Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA)* para observar el efecto de la adición de AHLs externas sobre diferentes biopelículas (Capítulo 4), se decidió desarrollar una modificación del mismo (Figura 55) para que la superficie de adhesión (hasta 16,2 cm²) fuese mayor con el objetivo de detectar posibles efectos sobre la biopelícula indetectables para el equipo xCELLigence®.



Figura 55. Modelo de adhesión activa desarrollado en el grupo de Acuicultura y Biotecnología de la USC, modificación del *Amsterdam Active Attach Model* (modelo AAA) desarrollado en ACTA.

Con el objetivo de determinar si esta metodología, combinada con la tinción con cristal violeta era adecuada para la detección de inhibición de biopelícula oral utilizando compuestos con actividad QQ, se utilizó el modelo AAA con saliva de un paciente sano en medio BHI que se le añadieron la lactonasa Aii20J y el extracto PCE20J. La adición de la enzima Aii20J redujo la formación de biopelícula un 30% al cultivarse en BHI cuando se utiliza el sistema de adherencia activa y se hace la cuantificación mediante la tinción con cristal violeta (Figura 56A). Este efecto inhibitorio fue incluso mayor, alcanzando un valor de 72,5%, cuando se suplementó el medio de cultivo BHI con el extracto PCE20J, probablemente debido a la presencia de la doble actividad QQ contra AHLs y AI-2 que presenta (Capítulo 2). La tinción con cristal violeta revela un cambio estructural de la biopelícula formada al añadir los compuestos con actividad QQ en comparación con el control, especialmente en el caso del extracto PCE20J (Figura 56B). Sin embargo, al tratarse de un extracto celular cuya composición es desconocida se decidió realizar los siguientes experimentos con la enzima purificada Aii20J.

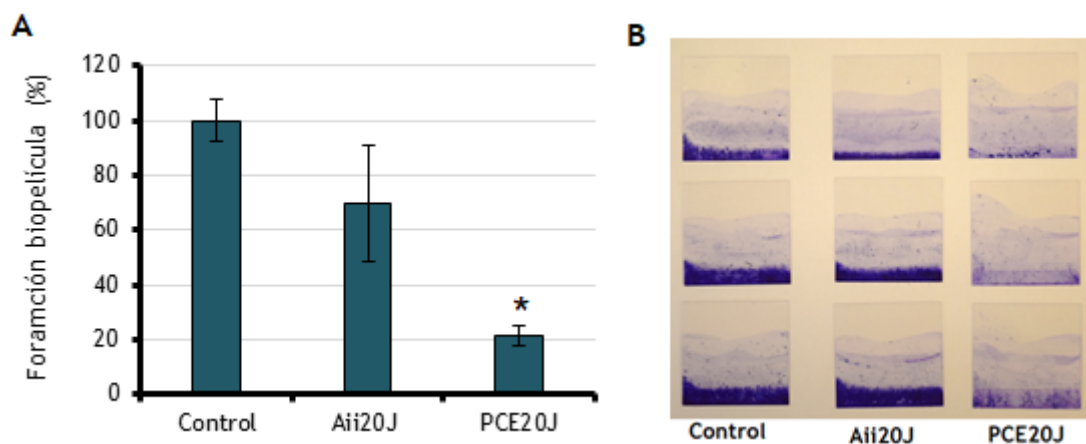


Figura 56. Cuantificación de la biopelícula oral formada en BHI a partir de la saliva de un donante sano durante 24 h y medida por tinción cristal violeta (A) e imagen de la adhesión (B). Se observó el efecto sobre la biopelícula del extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J (PCE20, 100 µg/mL) y de la lactonasa Aii20J (20 µg/mL). Los datos son representados como media ± SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, $p < 0.05$) con el control se marcaron con asteriscos.

Para comprobar que el efecto de Aii20J observado sobre la biopelícula formada por saliva procede exclusivamente de la actividad lactonasa y no de otro componente presente en la solución que contiene la enzima, se decidió realizar un ensayo de inhibición tanto con una inactivación de Aii20J tras someterlo a la autoclave 15 minutos como con el sobrenadante resultante de filtrar Aii20J a través de un CENTRICON YM-10 (Figura 57). La enzima Aii20J a la concentración usada (20 µg/mL) presentó una reducción significativa del 42,23% de la biopelícula formada a partir de una muestra de saliva de un donante sano (test t de Student, $p < 0,05$). En cambio, el sobrenadante no muestra efecto ninguno sobre la biopelícula y la enzima autoclavada muestra una reducción del 14,04% que se podría explicar por la actividad lactonasa residual debida a la alta termosestabilidad de Aii20J (Mayer et al., 2015).

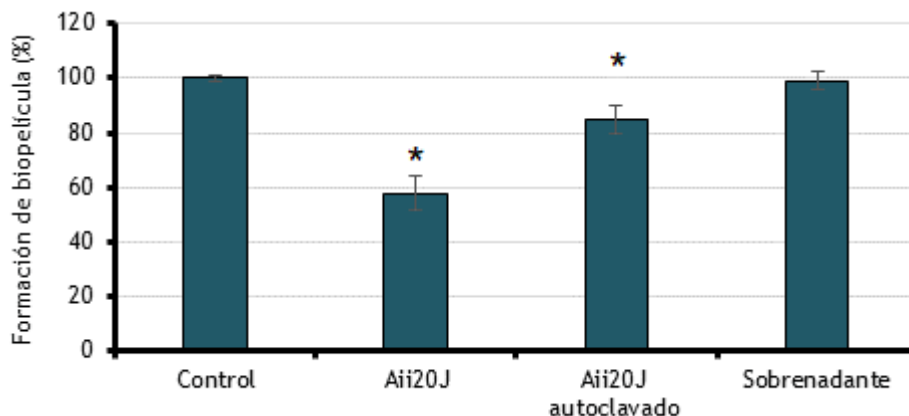


Figura 57. Ensayo de inhibición de biopelícula en el sistema de adherencia activa cuantificado mediante cristal violeta. Se observa el efecto de diferentes enzimas Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$): normal, autoclavado durante 15 minutos y sobrenadante resultante de filtrar Aii20J a través de un CENTRICON YM-10. Los datos son representados como media \pm SD ($n=3$). Las diferencias significativas (t de Student, $p<0.05$) con el control se marcaron con asteriscos.

Para excluir la inhibición de crecimiento de miembros del género *Streptococcus* como causa de la inhibición de Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sobre la biopelícula, se observó el efecto de su adición sobre la densidad óptica (600 nm) de cultivo de *S. mutans* mantenidos en agitación para evitar en lo posible la formación de biopelícula. En ninguno de los medios probados, BHI y BHI suplementado con sacarosa 0,1%, se observó una reducción de la densidad óptica de los cultivos al añadir Aii20J (Figura 58).

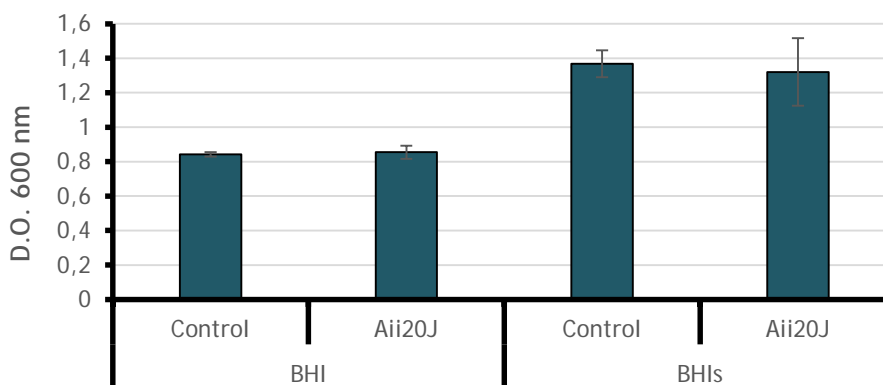


Figura 58. Ensayo de inhibición de crecimiento de la bacteria *S. mutans* cultivado en BHI y BHI suplementado con sacarosa 0,1% medido como densidad óptica (600 nm)

La adición de la enzima Aii20J causó un claro efecto inhibitorio sobre la biopelícula obtenida a partir de saliva de un paciente sano cultivada en BHI usando el modelo de adherencia activa (Figura 59A). Sin embargo, la biopelícula cultivada a partir del mismo inóculo y cultivada en las mismas condiciones en el equipo xCELLigence® no se vio afectada por la presencia de la lactonasa (Figura 59B). Este diferente efecto de Aii20J sobre una misma muestra utilizando dos metodologías distintas podría sugerir que en este caso el mecanismo de actuación de la lactonasa afecta más a la cantidad de biopelícula formada, cuantificada por el modelo AAA, que, al proceso de adhesión celular, cuantificado por el equipo xCELLigence®, y pone de manifiesto la necesidad de utilizar varios métodos de cuantificación para la identificación y caracterización de compuestos inhibitorios.

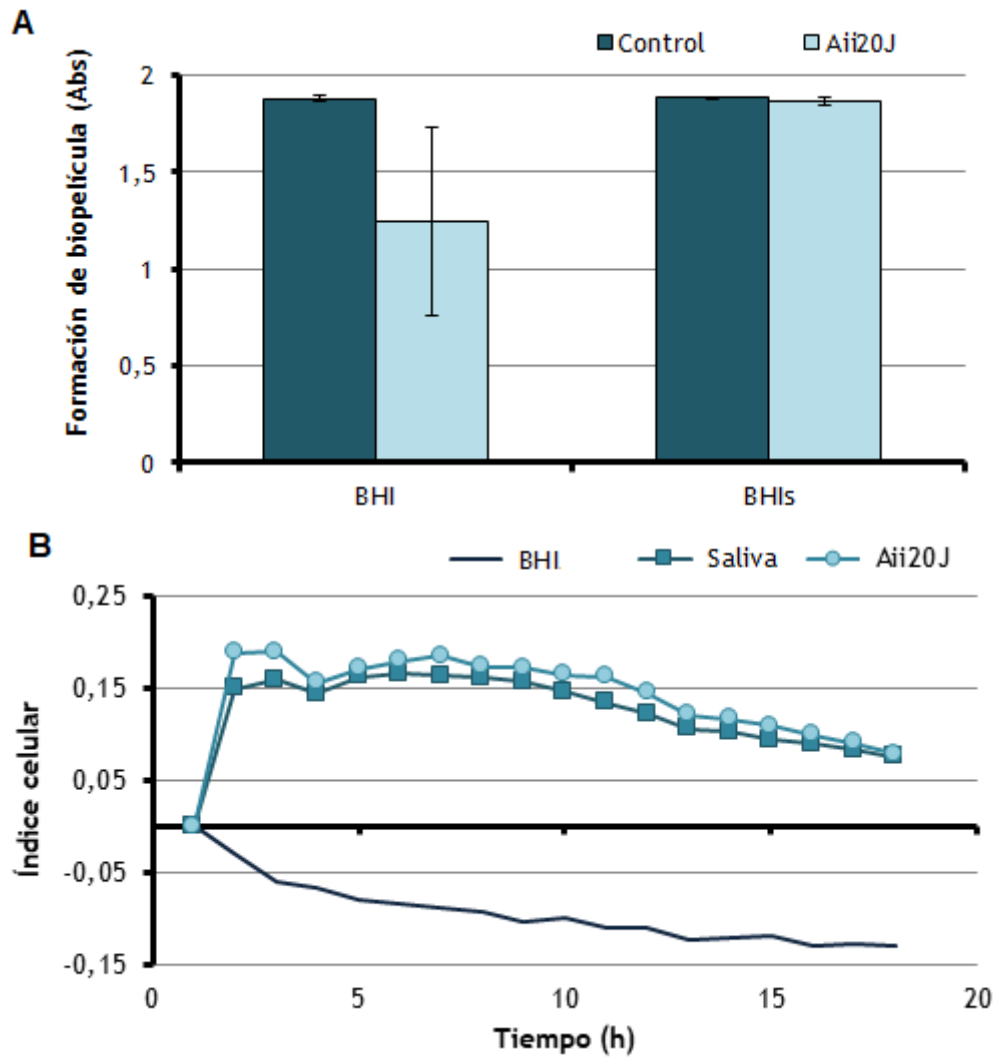


Figura 59. Cuantificación y efecto de Aii20J (20 µg/mL) en la biopelícula oral formada a partir de la saliva de un donante sano medida por tinción violeta (A) y por el equipo xCELLigence® (B). El inóculo se realizó en BHI. La formación de la biopelícula está expresada en absorbancia (A) e índice celular (B).

2.1 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la respuesta a Aii20J

Una vez demostrada la validez de la nueva metodología para la formación y cuantificación de biopelículas y dado que los experimentos del capítulo 3 se habían realizado con saliva congelada sin cepillado previo al menos durante 12 h, se probó el uso de este tipo de muestras, así como saliva fresca obtenida antes y después de llevar a cabo el cepillado a partir de un único donante sano con el objetivo de utilizar el inóculo más adecuado para el sistema. A simple vista la tinción con cristal violeta nos muestra como la adición de la enzima Aii20J causa una inhibición de la formación de la biopelícula en todas ellas (Figura 60A). No se observó un efecto significativo de la condición del inóculo respecto a la cantidad de biopelícula formada. Curiosamente, Aii20J muestra un mayor efecto inhibitorio contra las biopelículas obtenidas a partir de saliva congelada sin cepillado previo al menos durante 12 h (45,81%) y después del cepillado (41,46%) en comparación con los datos obtenidos contra la biopelícula formada con saliva fresca obtenida antes del cepillado (23,65%) (Figura 60B).

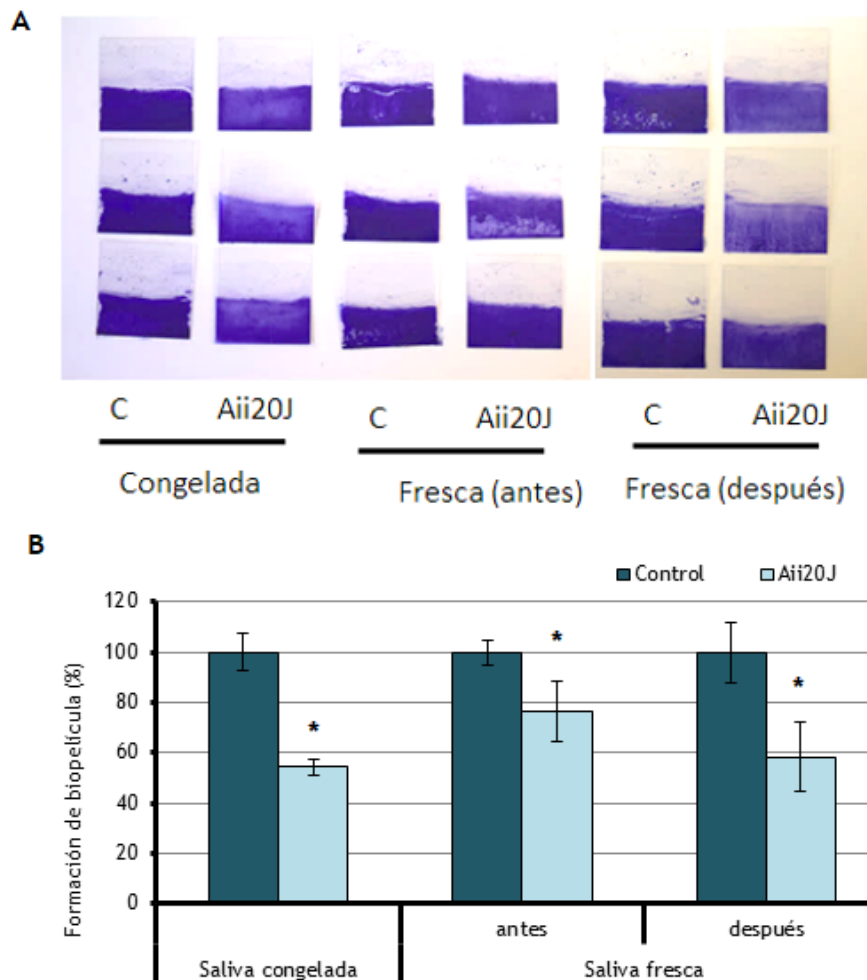


Figura 60. A) Tinción con cristal violeta de la biopelícula en el sistema de adherencia activa con saliva congelada en comparación con saliva fresca, tomada antes o después de que el donante se limpiara los dientes; B) Formación de la biopelícula en el sistema de adherencia activa con saliva congelada en comparación con saliva fresca, tomada antes o después de que el donante se limpiara los dientes. La cuantificación se realizó por tinción con cristal violeta. Los datos son representados como media \pm SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, $p < 0,05$) con el control se marcaron con asteriscos.

Con el objetivo de determinar la importancia de la renovación del medio de cultivo, característica fundamental del modelo AAA, se realizó un experimento en el que se comparó la formación de biopelícula tras 24 horas de crecimiento con y sin cambio de medio. A simple vista se observa como la renovación del medio tras las primeras 12 h de incubación provoca un enorme crecimiento en la formación de la biopelícula (Figura 61), de forma que no llevar a cabo este procedimiento hace que la cantidad adherida sea mucho menor. El cambio de medio de cultivo también parece afectar al efecto de la enzima Aii20J sobre la biopelícula oral. De esta forma, cuando se realiza el cambio de cultivo a las 12 h la cuantificación de las biopelículas por cristal violeta muestra una inhibición significativa (test t de estudent, $p < 0,05$) de Aii20J cuando la saliva se incuba en BHI (55,94%), siendo mucho menor al utilizar BHI suplementado con sacarosa (12,6%). Cabe destacar que, aunque la cuantificación por CV en este último caso apenas muestra inhibición (Figura 61B), en la imagen se muestra un claro efecto de Aii20J sobre la formación de la biopelícula (Figura 61A). Sin embargo, si no se realiza cambio de cultivo se observa una mayor inhibición de Aii20J sobre la biopelícula formada con sacarosa (62,47%) que en su ausencia (30%).

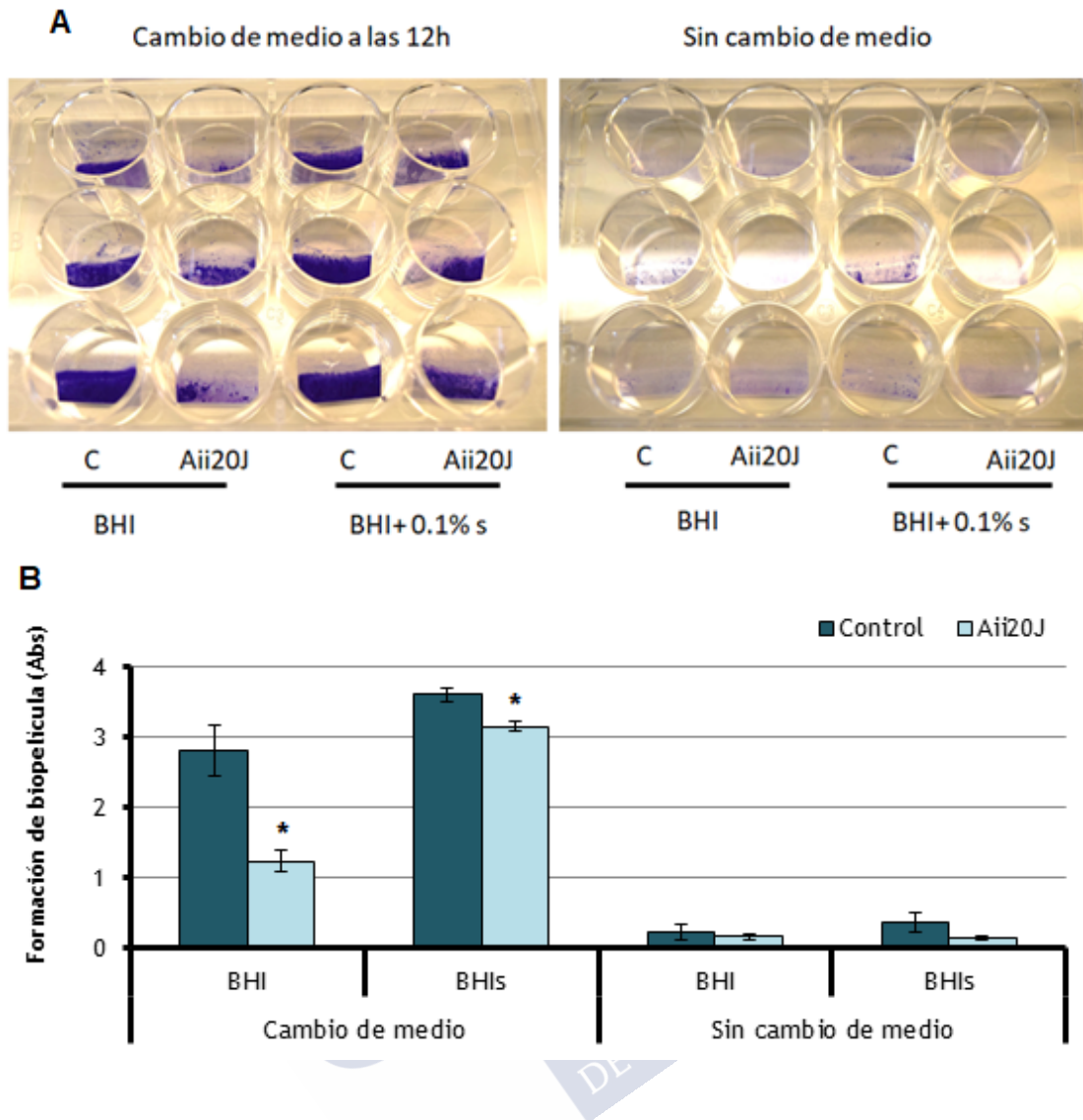


Figura 61. Cuantificación de la formación de biopelícula oral en aerobiosis a partir de saliva congelada tras 24 horas de incubación habiendo realizado o no cambio de medio de cultivo. El cultivo se realizó en condiciones de aerobiosis en los medios BHI y BHI suplementado con 0,1% sacarosa con y sin la lactonasa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos son representados como media \pm SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, $p < 0,05$) con el control se marcaron con asteriscos.

2.2 Optimización del tiempo de incubación

Confirmada la importancia del cambio de medio para la formación de la biopelícula, se decidió optimizar el tiempo de incubación para este modelo. Para el cultivo en aerobiosis, apenas se observó formación de biopelícula a las 12 h de incubación mientras que como era de esperar la mayor formación de biopelícula se dio a las 48 h de crecimiento (Figura 62A). A pesar de esto la enzima Aii20J mostró mayor reducción de la biopelícula a las 24 h, con valores de inhibición del 58,14% y del 36,46% y del para las muestras cultivadas en BHI y BHI con sacarosa, respectivamente. Nuevamente, las biopelículas cultivadas en BHI son más sensibles al efecto de la enzima y aquellas crecidas en BHI con sacarosa parecen dejar de tener efecto tras 24h-48 h de incubación (Figura 62B). Se puede apreciar que con las biopelícula obtenidas a partir de muestras de saliva de un paciente sano y cultivadas en aerobiosis de muestras la metodología de tinción con cristal violeta no solo cuantifica una menor cantidad de biopelícula, sino que

también muestra la presencia de una estructura más granulosa cuando se añade la enzima Aii20J con comparación con la biopelícula control.

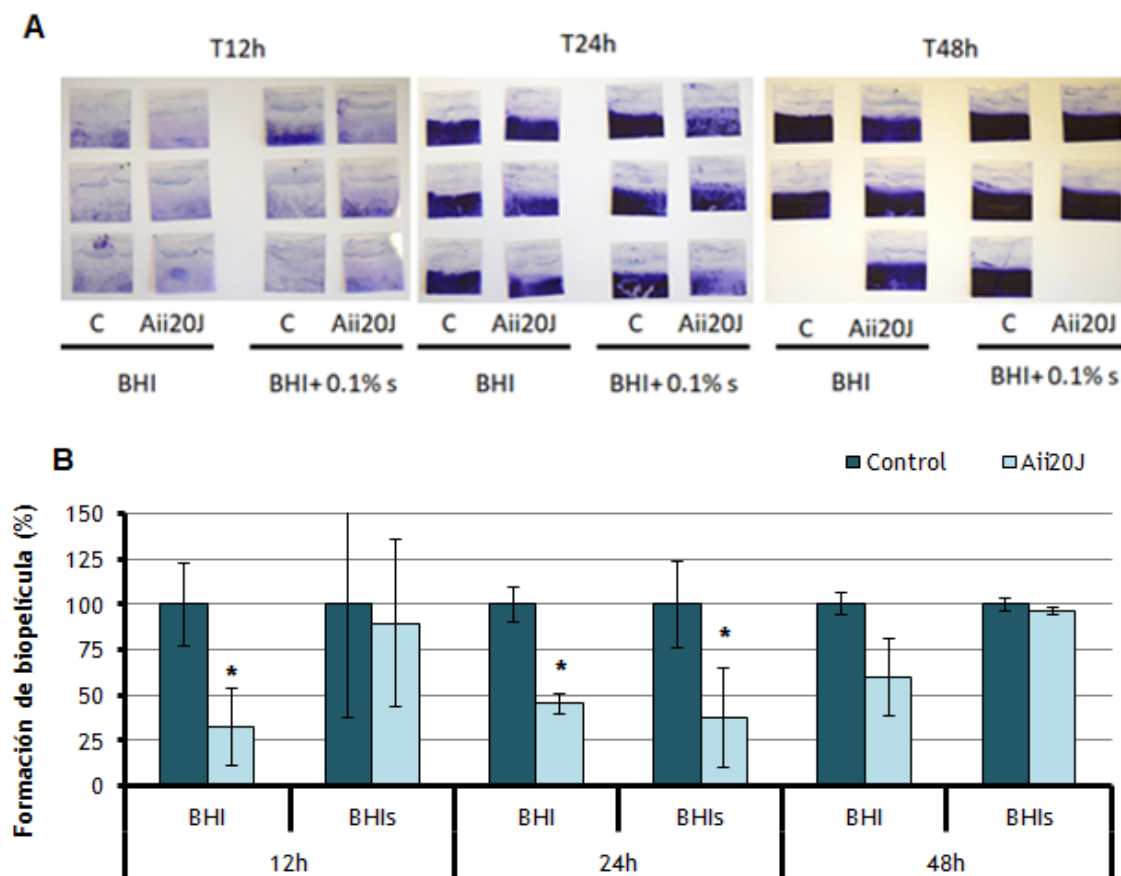


Figura 62. Cuantificación de la formación de biopelícula oral a partir de una muestra de saliva congelada a diferentes tiempos de incubación utilizando el sistema de adhesión activa. El cultivo se realizó en condiciones de aerobiosis en los medios BHI y BHI suplementado con 0,1% sacarosa con y sin la lactonasa Aii20J (20 µg/mL). Los datos son representados como media± SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, p<0,05) con el control se marcaron con asteriscos.

Dado que las bacterias anaerobias suelen presentar un crecimiento más lento, se decidió utilizar diferentes tiempos de incubación con respecto a la optimización en condiciones aerobias. Además, en lugar de utilizar BHI suplementado con sacarosa, se utilizó BHI-2 que es un medio que presenta nutrientes que favorecen el crecimiento de patógenos orales (Sánchez et al., 2011) y tras las primeras 24 h de incubación solo se realizó un cambio de medio al día. La cantidad de biopelícula formada con BHI-2 fue tal que a partir de las 48 h de incubación la biopelícula se desprendió de la superficie del cobre (Figura 63A), impidiendo su correcta cuantificación. Este suceso ha hecho que la actividad inhibitoria de Aii20J observada en la biopelícula cultivada en BHI-2 no pueda ser interpretada pues la cantidad de biopelícula cuantificada no es representativa de la formada en un principio (Figura 63). En cuanto al medio BHI, se observó una importante inhibición de la biopelícula cultivada durante 24 h en anaerobiosis (52,01%).

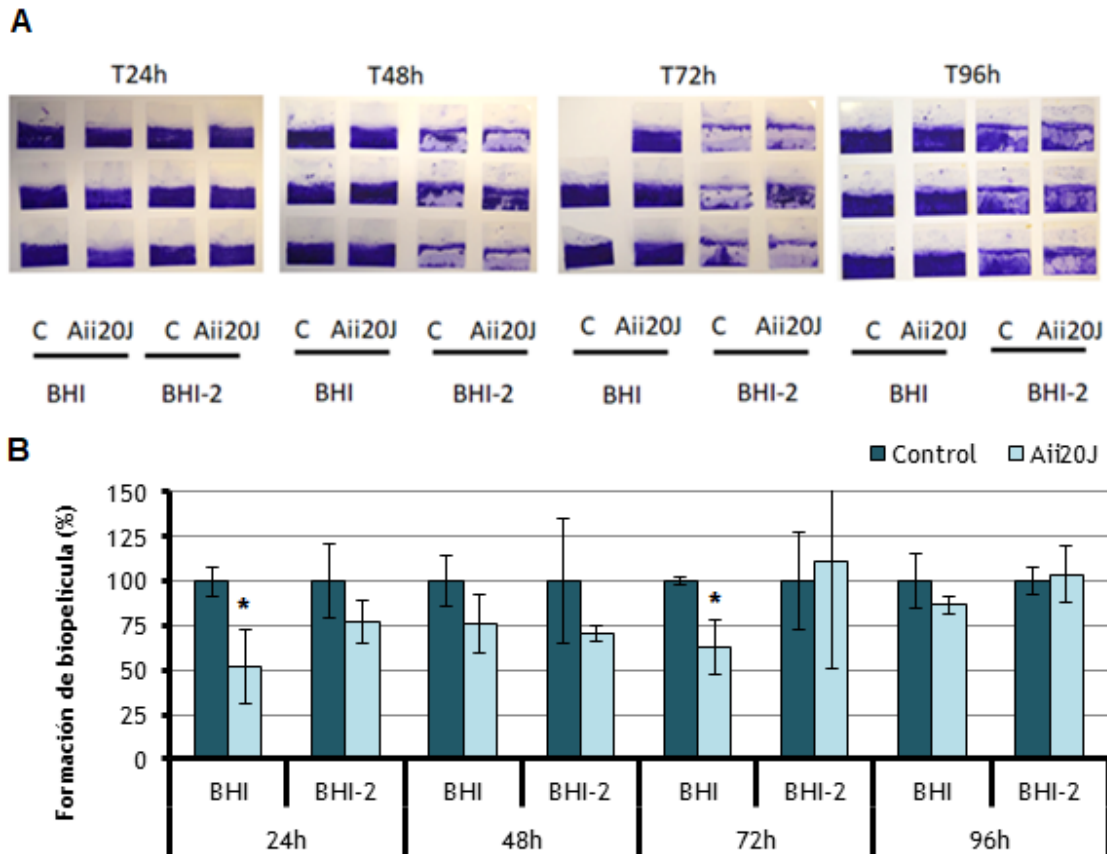


Figura 63. Formación de biopelícula oral obtenida a partir de saliva congelada a diferentes tiempos de incubación utilizando el sistema de adhesión activa. El cultivo se realizó en condiciones de anaerobiosis en los medios BHI y BHI-2 y sin la lactonasa Aii20J (20 μ g/mL). Los datos son representados como media \pm SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, $p < 0,05$) con el control se marcaron con asteriscos.

2.3 Efecto de Aii20J sobre distintas biopelículas clínicas

Dado que la optimización de las distintas condiciones de cultivo se realizó con la saliva de un único donante sano, se decidió probar el efecto de Aii20J en muestras de otros pacientes con el objetivo de determinar la viabilidad del uso de compuestos de QQ para prevenir y/o ayudar en la eliminación de la biopelícula oral. Como control positivo del experimento se incluyó nuevamente la saliva del donante que se utilizó para hacer la optimización del modelo AAA. Destaca la biopelícula formada por esta muestra (Figura 64, saliva 1) que es hasta 6 veces mayor que el resto y que, a pesar de proceder de una persona sana, presenta un fenotipo hiper-formador de placa dental. Aunque la mayoría de las muestras procedentes del resto de pacientes sanos (Figura 64, salivas 2, 3 y 4) presentan menor cantidad de biopelícula que los pacientes con enfermedad oral (Figura 64, pacientes 5, 6, 7 y 8), con el número de muestras clínicas probadas no se puede establecer una relación entre la cantidad de biopelícula cuantificada con esta metodología y la presencia de patologías orales en el paciente.

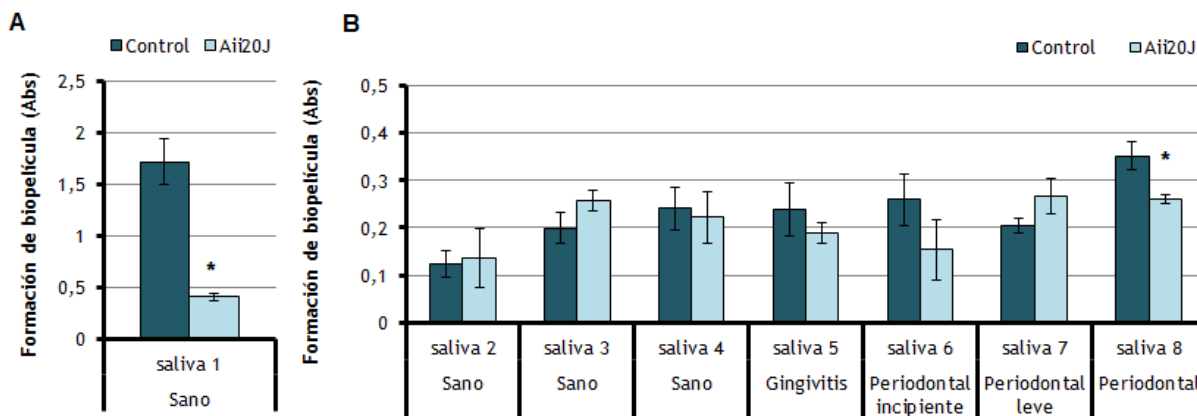


Figura 64. Formación de biopelícula oral formada a partir de diferentes muestras utilizando el sistema de adhesión activa medida mediante cristal violeta. El cultivo se realizó en condiciones de aerobiosis durante 24 h en el medio BHI con y sin la lactonasa Aii20J (20 µg/mL). Los datos son representados como media± SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, p<0,05) con el control se marcaron con asteriscos.

Al añadir la enzima Aii20J a la saliva 1 se observa una inhibición significativa del 76,44% en la formación de la biopelícula (test t de Student, p<0,05, Figura 65). Aunque en menor medida también se observa un efecto inhibitorio de Aii20J en 3 de las 7 salivas con distintas patologías probadas: las muestras de saliva 5 (20,82%), 6 (40,88%) y 8 (26,05%). Todas las muestras en las que la enzima Aii20J redujo la formación de biopelícula presentaron una absorbancia de cristal violeta mayor de 0,20. Por lo que Aii20J debería de interferir con algún elemento clave de la formación de la biopelícula gruesa siendo necesarios más experimentos para caracterizar su efecto sobre la adhesión inicial.

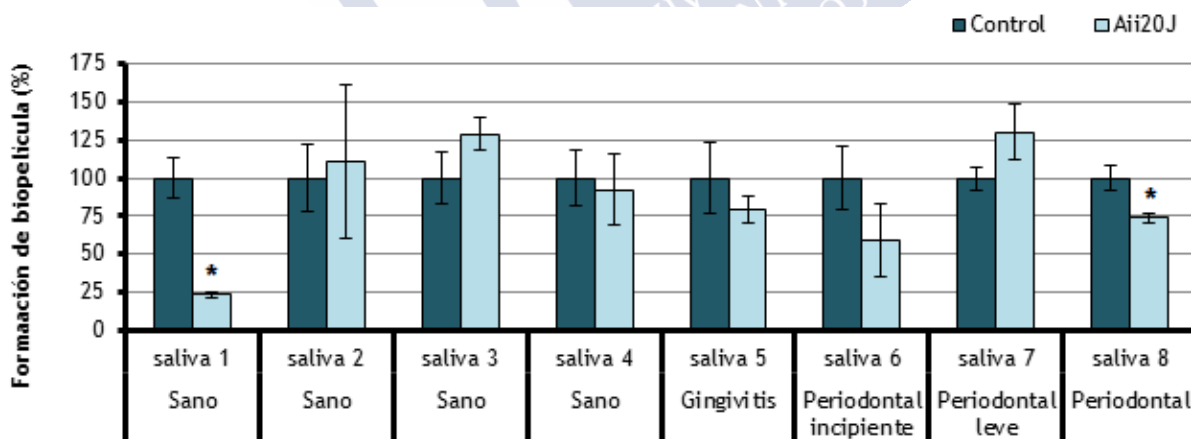


Figura 65. Porcentaje de la formación de biopelícula oral formada a partir de diferentes muestras utilizando el sistema de adhesión activa. El cultivo se realizó en condiciones de aerobiosis durante 24 h en el medio BHI y sin la lactonasa Aii20J (20 µg/mL). Los datos son representados como media± SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, p<0,05) con el control se marcaron con asteriscos.

3. Comparación del efecto de Aii20J sobre una biopelícula sana y una biopelícula periodontal

Dados los interesantes resultados obtenidos para el uso de Aii20J para reducir la formación de la biopelícula oral, se decidió caracterizar con más detalle su efecto en muestras de una persona sana y una persona con enfermedad periodontal. Además, se

realizó la identificación de las especies bacterianas presentes en las diferentes muestras con el objetivo de profundizar en el posible mecanismo de acción. Para ello, a la vez que se realizó la cuantificación de biomasa bacteriana adheridas mediante tinción con cristal violeta también se recogió biomasa suficiente para la extracción de ADN de la biopelícula. Nuevamente Aii20J presenta una clara inhibición de la biopelícula del paciente sano en los diferentes medios de cultivo utilizados tanto en aerobiosis (50,08% y 45,6%) como cuando se cultiva en anaerobiosis (53,37% y 17,28%) (Figura 66). En cambio, en el caso de la biopelícula del paciente periodontal Aii20J tiene efecto inhibitorio cuando esta se cultiva en BHI con sacarosa en aerobiosis (16,94%) (Figura 66A) o en BHI-2 en anaerobiosis (21,86%) pero no en BHI (Figura 66B). Esto podría sugerir una pérdida en la importancia de las bacterias clave sobre las que Aii20J interfiere en su comunicación presentes en la muestra periodontal cultivable en BHI y que son relevadas en su papel cuando son cultivadas en este medio y condiciones de anaerobiosis. En mayores tiempos de incubación podría cambiar este resultado, pero no sería medible con esta técnica.

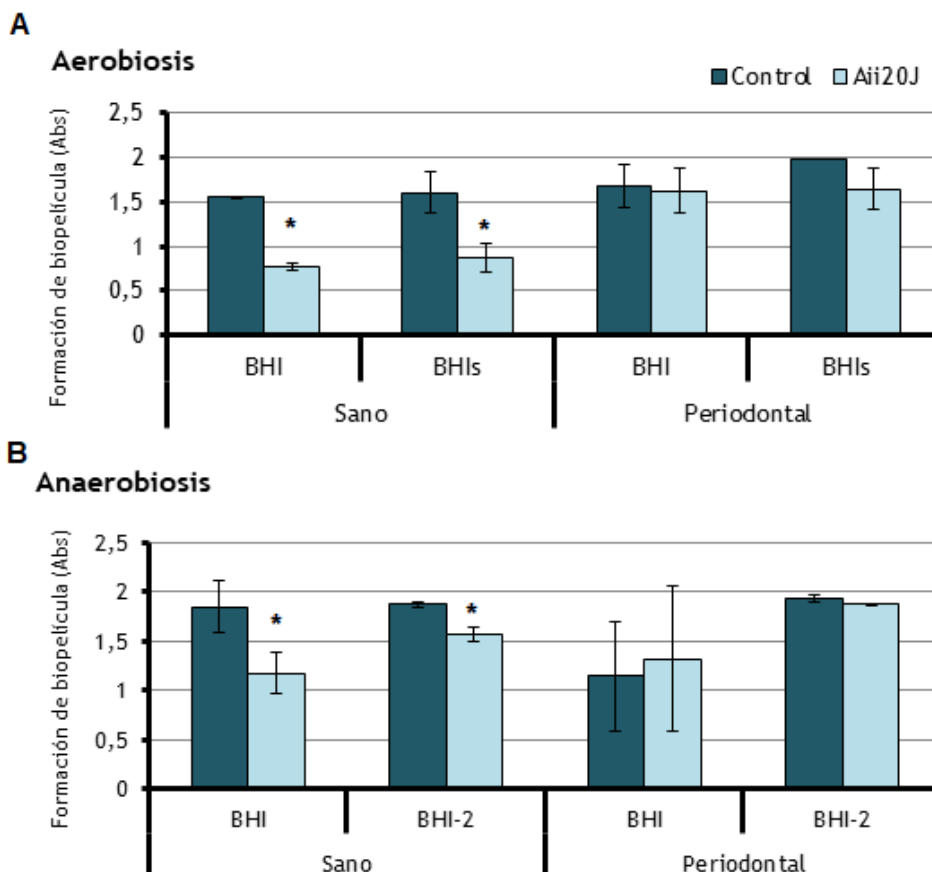


Figura 66. Efecto de la lactonsa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano y un paciente con enfermedad periodontal utilizando el sistema de adhesión activa y cuantificada por tinción con cristal violeta. El cultivo se realizó en los medios BHI y BHI suplementado con 0,1% sacarosa durante 24 h en condiciones de aerobiosis (A) y medios BHI y BHI-2 en condiciones de anaerobiosis (B). Los datos son representados como media \pm SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, $p < 0,05$) con el control se marcaron con asteriscos.

Como la cantidad de ADN obtenido de las muestras cultivadas en anaerobiosis fue insuficiente para la secuenciación de las mismas, se decidió repetir el experimento incubando ambos tipos de saliva únicamente en el medio BHI durante 24 y 48 h ya que se descartó el uso de BHI-2 por el desprendimiento que se produce de la biopelícula

cuando esta se incuba más de 24 h. Aunque puede observarse claramente como el precipitado obtenido para la posterior extracción de ADN es menor cuando se añade Aii20J independiente de que la biopelícula tenga 24 h o 48 h para el paciente sano (Figura 67A) al realizar la tinción con cristal violeta (Figura 67B) parece que la enzima únicamente mantiene su efecto en las primeras 24 h de incubación. Esto pone de manifiesto las limitaciones del cristal violeta ya mencionadas anteriormente como son la alteración de la biopelícula por la necesidad de hacer varios lavados y la tinción indiscriminada (Capítulo 2),

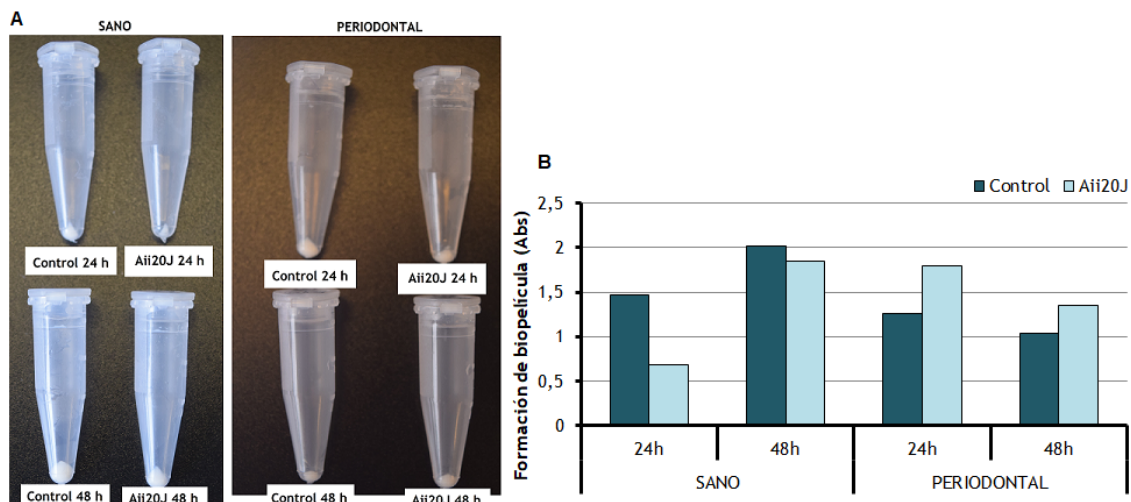


Figura 67. Efecto de la lactonasa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano y un paciente con enfermedad periodontal utilizando el sistema de adhesión activa. El cultivo se realizó en el medio BHI durante 24 y 48 h en condiciones de anaerobiosis. Se muestra la biomasa obtenida para la extracción de ADN (A) y la cuantificación mediante tinción con cristal violeta (B).

Sorprendentemente los resultados de la secuenciación indicaron que todas las cepas presentes en las muestras pertenecían al género *Streptococcus*. Únicamente las muestras del paciente periodontal cultivadas en anaerobiosis contenían también cepas del género *Lactobacillus*, cuya abundancia se vio reducida en presencia de Aii20J especialmente a las 48 h (Figura 68). Las biopelículas cultivadas con BHI en condiciones de aerobiosis presentaron un mayor número de OTUs (40-75) que aquellas en las que el medio se suplementó con sacarosa (38-39), independientemente de que el inóculo de saliva con fuera obtenido de un paciente sano o un paciente periodontal. En cambio, en condiciones de anaerobiosis las biopelículas del paciente periodontal presentaron más OTUs (52-70) en comparación con el paciente sano (45-56) con la excepción del control de las 48 h (82 OTUs). Algunos OTUs como OTU178, OTU179 y OTU196 aparecieron en todas las muestras del paciente periodontal pero solo se identificaron en las muestras del paciente sano que fueron incubadas 48 h en anaerobiosis. Los resultados no mostraron una correlación entre la cantidad de biomasa bacteriana obtenida y el número de secuencias obtenidas (datos no mostrados).

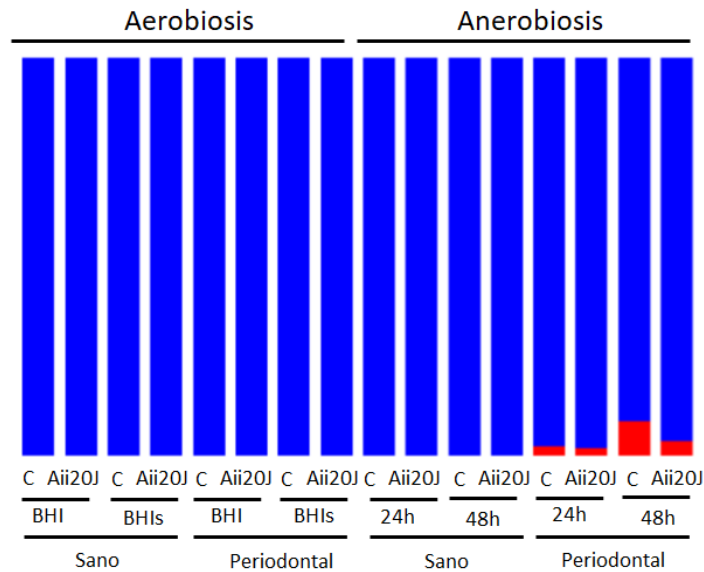


Figura 68. Histograma de los géneros presentes en las muestras de las biopelículas secuenciadas. Únicamente se observa la presencia de representantes de los géneros *Streptococcus* (azul) y *Lactobacillus* (rojo).

4. Caracterización del efecto de Aii20J sobre la formación y composición bacteriana de biopelícula sana

En vista de los sorprendentes resultados obtenidos en la secuenciación de las biopelículas obtenidas en BHI y BHI con sacarosa 0,1% en aerobiosis y anaerobiosis en los que únicamente se obtuvieron representantes de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*, se decidió secuenciar nuevamente muestras de biopelícula utilizando dos medios de cultivo nuevos, Schaedler suplementado con vitamina K1 y medio McBain, con el objetivo de comprobar si la baja diversidad bacteriana observada fue debido a un problema en la metodología de cultivo o en la de secuenciación. Así se cultivaron biopelículas en los medio BHI, Schaedler y McBain en condiciones de aerobiosis (24 h) y anaerobiosis (48 h y 72 h) a partir de una única muestra de saliva de un paciente sano.

El medio de cultivo Schaedler suplementado con vitamina K1 fue con diferencia el que permitió la mayor formación de biopelícula tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Figura 69). Aunque la adhesión de las bacterias con el medio McBain fue mucho más lenta, también permitió la formación de una biopelícula robusta tras 72 h de cultivo. En cambio, tras la manipulación con el cristal violeta la biopelícula de 72 h cultivada en BHI se desprendió, probablemente por la gran cantidad de biomasa alcanzada.

La adición de la enzima Aii20J mostró actividad inhibitoria significativa sobre la biopelícula formada en BHI tanto en aerobiosis (19,07%) como en las primeras 48 de anaerobiosis (23,41%) (test t de Student, $p < 0,05$, Figura 70). Probablemente no se ha podido observar este efecto también a las 72 h de incubación en anaerobiosis por la caída de la biopelícula de los cubres utilizados como controles en esta condición (Figura 69). Este desprendimiento no se observa cuando se adiciona Aii20J lo que indicaría un cambio en la estructura de la biopelícula probablemente debido a una modificación en la composición bacteriana de la misma. La inhibición causada por Aii20J fue mayor en experimentos previos (media $47,40\% \pm 10,15$, 10 experimentos independientes) pudiendo deberse a un cambio en la composición bacteriana de la saliva del paciente a lo largo del

tiempo en el que se realizó el presente trabajo. Aii20J no parece tener efecto en los otros dos medios utilizados, Schaedler y McBain.

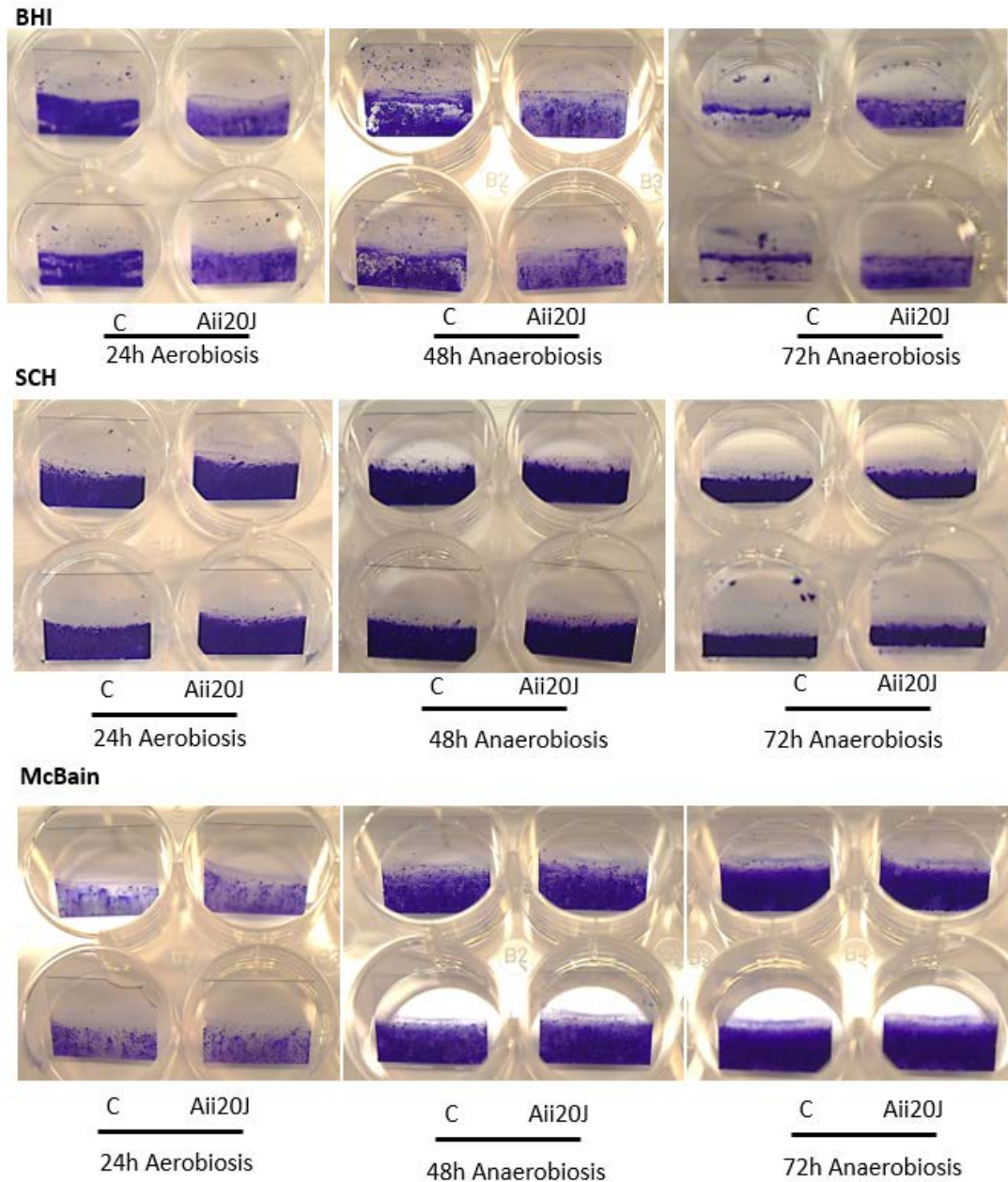


Figura 69. Imágenes de las biopelículas obtenidas utilizando saliva de un paciente sano y cultivada en BHI, Schaedler (SCH) y McBain en diferentes condiciones y a diferentes tiempos de incubación.

Datos similares se obtuvieron al repetir este experimento, en el que se decidió cuantificar también la biopelícula formada a 24 h en condiciones de anaerobiosis (Figura 70B). La enzima presentó inhibición significativa de las biopelículas a las 24 horas de incubación en el medio BHI, tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis, y tras 72 h de cultivo (test t de Student, $p < 0,05$). En este experimento no se observó reducción de la biopelícula a las 48 h.

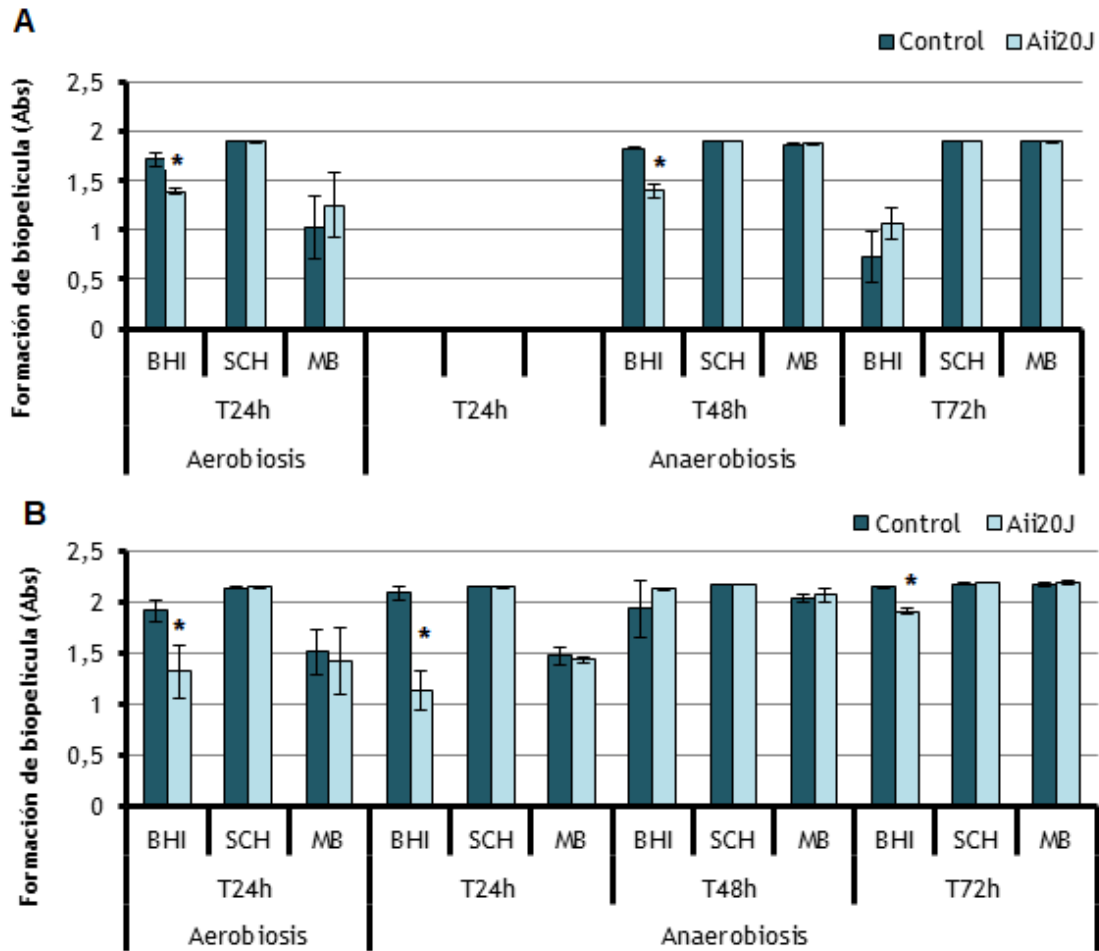


Figura 70. Efecto de la lactonsa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la biopelícula oral obtenida a partir de un paciente sano utilizando el sistema de adhesión activa. El cultivo se realizó en los medios de cultivo BHI, Schaedler (SCH), McBain (MB) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis en octubre del 2018 (A) y abril de 2019 (B). Los datos son representados como media \pm SD (n=3). Las diferencias significativas (t de Student, $p < 0,05$) con el control se marcaron con asteriscos.

Para comprobar la presencia de cepas distintas a *Streptococcus* antes de la secuenciación se llevó a cabo el aislamiento de bacterias cultivables de las diferentes biopelículas sobre agar Schaedler con sangre suplementado con vitamina K1 que se incubaron durante 7 días a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Así, se observaron claras diferencias entre las cepas cultivables obtenidas a partir de las biopelículas formadas en las diferentes condiciones utilizando los diferentes medios de cultivo. Por ejemplo, las bacterias aerobias presentes en las biopelículas fueron morfológicamente diferentes en los tres medios de cultivo utilizados. En BHI crecieron en su mayoría bacterias con pigmentación amarilla mostrando un tamaño muy similar todas ellas (Figura 71A). En cambio, en medio SCH las bacterias presentaron diferentes tamaños y colores, habiendo bacterias de color marrónáceo, amarillento y blanquecinas (Figura 71B). Las bacterias procedentes de la biopelícula crecidas en medio McBain era de mucho menor tamaño y presentaban pigmentación de color marrón (Figura 71C).

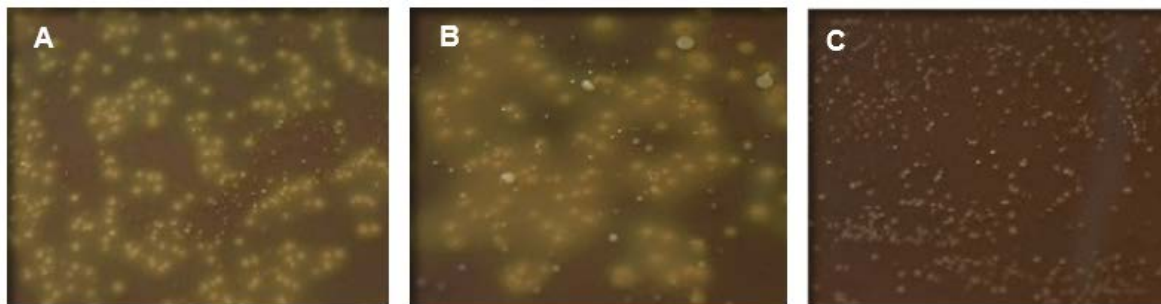


Figura 71. Bacterias en placa de agar Schaedler con sangre y vitamina K1 obtenidas de las biopelículas formadas durante las primeras 24 h en aerobiosis en los tres medios de cultivo tras incubación en anaerobiosis: BHI (A), Schaedler (B) y McBain (C).

El análisis de la composición bacteriana mediante la secuenciación masiva de las muestras cultivadas *in vitro* utilizando la modificación del modelo AAA mostró enormes diferencias entre las diferentes biopelículas orales incubadas en distintos medios (BHI, Schaedler y McBain) y condiciones (aerobiosis y anaerobiosis). De entre los tres medios de cultivo utilizados, el medio McBain fue el que presentó un mayor índice de Shannon (0,62-2,5) en comparación con los medios BHI (0,02-1,39) y Schaedler (0,01-0,13), indicando la presencia de una mayor diversidad (Figura 71A).

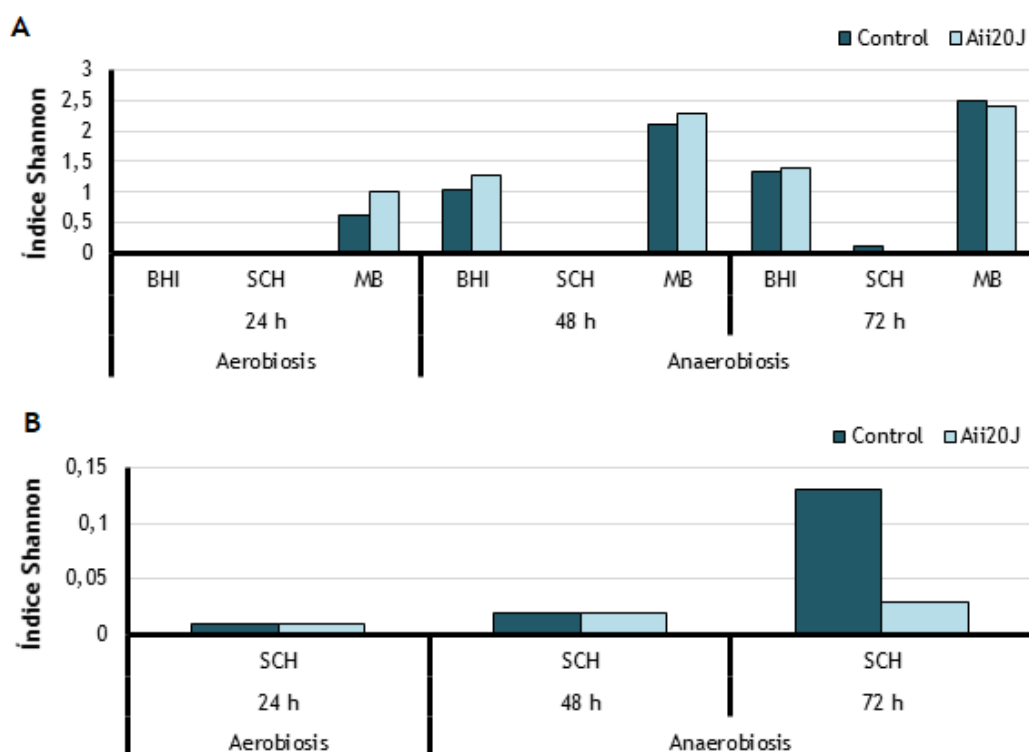


Figura 72. Efecto de la adición de Aii20J (20 µg/mL) sobre el índice de Shannon y la formación de biopelícula en las muestras cultivadas en los medios BHI, Schaedler (SCH) y McBain en condiciones de aerobiosis (24 h) y anaerobiosis (48 h y 72 h).

El efecto de la adición de la enzima Aii20J sobre la composición bacteriana de las biopelículas fue diferente en los distintos medios utilizados, lo que pone de manifiesto la importancia de una correcta selección de las condiciones de cultivo. Los índices de Shannon de las diferentes muestras obtenidas en el medio BHI a 24 h en aerobiosis, 0,02, y a 48 y 72 h en anaerobiosis, 1,05 y 1,33, respectivamente fueron menores que los

obtenidos al añadir Aii20J (0,03, 1,27 y 1,39), lo que indicaría una mayor diversidad bacteriana en presencia de la enzima además de una disminución de la cantidad de biopelícula medida con cristal violeta (Tabla 10). Este aumento en el valor del índice de Shannon al añadir Aii20J también se observó en el medio de cultivo McBain tanto para la muestra en aerobiosis (0,62 a 1) como para la de 48 h en anaerobiosis (2,09 a 2,28). En cambio, aunque este aumento en el índice de Shannon no se observó en medio Schaedler al añadir Aii20J (Figura 72B), la presencia de la lactonasa aumento el número de OTUS en la muestra de 48 h cultivada en condiciones de anaerobiosis (Tabla10). De hecho, la adición de Aii20J en medio Schaedler mostró una reducción del índice de Shannon de hasta cuatro veces tras 72 h de incubación en anaerobiosis (0,13 a 0,03). Curiosamente, parece aquellas biopelículas donde la adición de Aii20J produce algún tipo de inhibición son las mismas que contienen un número mayor de OTUs en comparación con las muestras sin tratar con la lactonasa (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de la adición de Aii20J (20 µg/mL) sobre el número de OTUs, el índice de Shannon y la formación de biopelícula en las muestras cultivadas en los medios BHI, Schaedler (SCH) y McBain en condiciones de aerobiosis (24 h) y anaerobiosis (48 h y 72 h).

Medio de cultivo	Tiempo incubación	Número de OTUS		Índice de Shannon		Inhibición biopelícula (%)
		Control	Aii20J	Control	Aii20J	
BHI	24h	5	6	0,02	0,03	31,67
	48h	13	19	1,05	1,27	23,41
	72h	17	18	1,33	1,39	-
SCH	24h	5	5	0,01	0,01	-
	48h	5	10	0,02	0,02	0,04
	72h	19	11	0,13	0,03	-
McBain	24h	12	15	0,62	1	5,69
	48h	35	35	2,09	2,28	-
	72h	34	34	2,5	2,4	-

El análisis de los componentes principales indica que el PC1 explica el 87,82% de la varianza diferenciando entre las biopelículas crecidas en anaerobiosis en los medios BHI y McBain, y aquellas cultivadas en BHI y McBain en aerobiosis y todas las inoculadas en Schaedler (Figura 73). Se puede apreciar que las distintas muestras se pueden dividir en tres grupos diferentes: 1) compuesto por todas las biopelículas crecidas en Schaedler y aquellas crecidas en condiciones de aerobiosis tanto usando BHI como McBain; 2) biopelículas inoculadas en BHI en anaerobiosis y 3) biopelículas cultivadas en McBain en anaerobiosis. Dado que la enzima parece afectar a las biopelículas cultivadas en BHI y McBain se realizaron análisis de componentes principales para las muestras de cada medio de cultivo por separado.

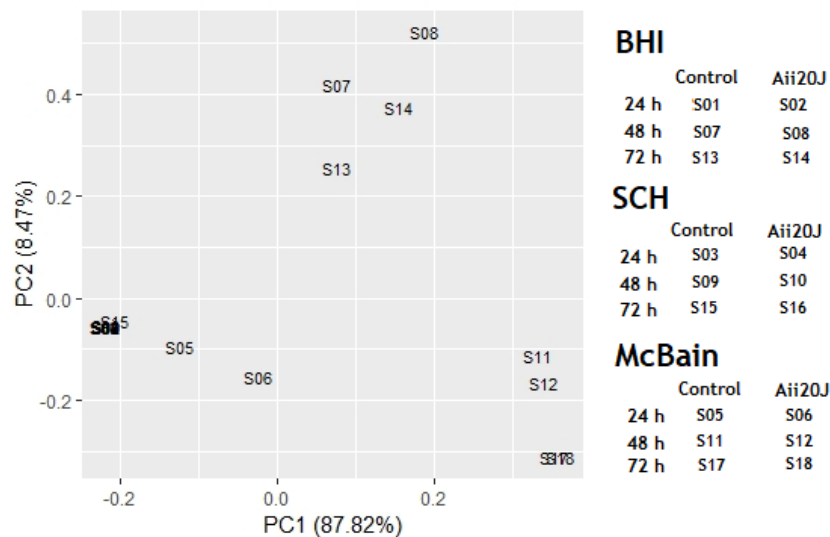


Figura 73. Comparación de la composición de especies en las biopelículas con datos de un mismo experimento (n = 1). PC1 explica el 87,82% de la varianza.

En las biopelículas cultivadas en BHI se observó un cambio en el eje PC1 según las muestras se hubieran crecido en condiciones de aerobiosis (S01 y S02) o en anaerobiosis (S07, S08, S13 y S14), lo que explica el 97,61% de la varianza (Figura 74). Las muestras de S01 y S02, que se corresponden con las muestras en aerobiosis 24 h, son idénticas pese a las claras diferencias observadas con la tinción con cristal violeta, lo que parece indicar la existencia de diferencias fenotípicas, pero no genotípicas causadas por la adición de Aii20J. En cambio, la presencia de la enzima genera cambios en las condiciones de anaerobiosis que se reflejan en el eje PC2 (2,27% de la varianza).

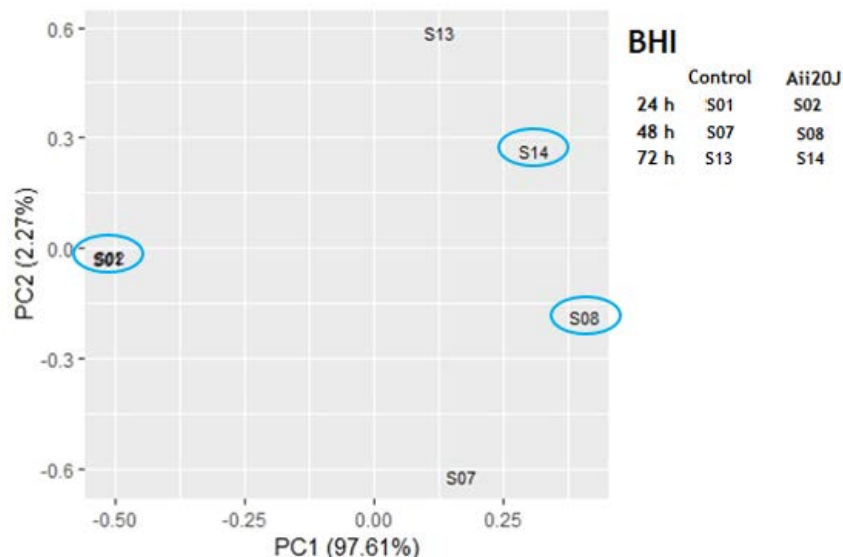


Figura 74. Comparación de la composición de especies en la biopelículas cultivadas en BHI con datos de un mismo experimento (n = 1). PC1 explica el 97,61% de la varianza. Se marcan en azul las muestras con enzima Aii20J (20 µg/mL).

En las biopelículas cultivadas en Schaedler se observó una gran similitud de las muestras. Únicamente la muestra en anaerobiosis 72 h (S15) parece diferenciarse del resto en función del PC1, que explica el 98,91% de la varianza (Figura 75), mientras que la

misma muestra con Aii20J (S16) se alinea con el resto de muestra por lo que parece que la enzima contrarresta el desarrollo de la biopelícula a 72 h.

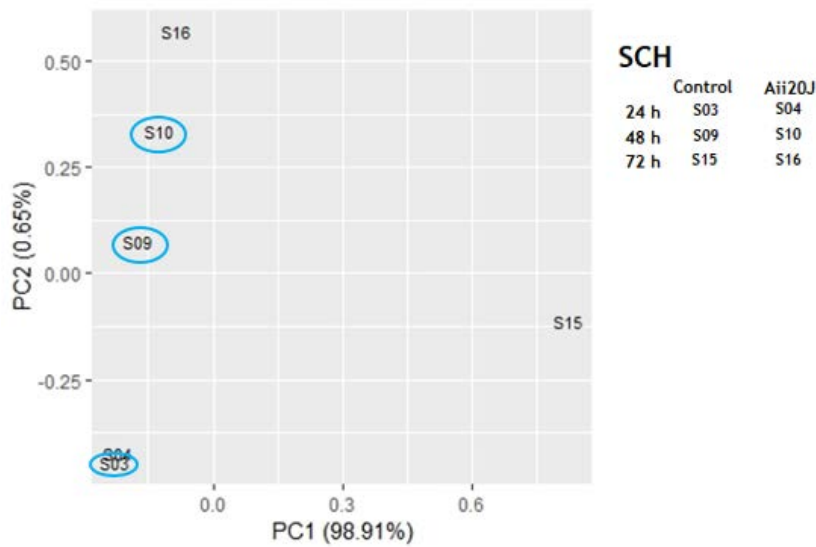


Figura 75. Comparación de la composición de especies en la biopelículas cultivadas en Schaedler con datos de un mismo experimento ($n = 1$). PC1 explica el 98,91% de la varianza. Se marcan en azul las muestras con enzima Aii20J (20 $\mu\text{g/mL}$).

En las biopelículas cultivadas en McBain se observó un cambio en el eje PC1 según las muestras se hubieran crecido en condiciones de aerobiosis (S05 y S06) o en anaerobiosis (S11, S012, S17 y S18), lo que explica el 89,93% de la varianza (Figura 76). En este medio de cultivo la adición de Aii20J produce pocos cambios.

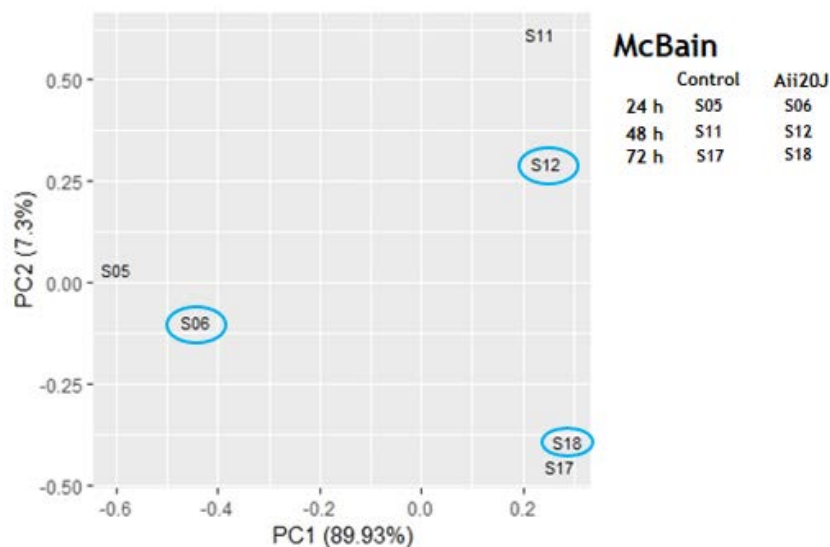


Figura 76. Comparación de la composición de especies en la biopelículas cultivadas en McBain con datos de un mismo experimento ($n = 1$). PC1 explica el 89,93% de la varianza. Se marcan en azul las muestras con enzima Aii20J (20 $\mu\text{g/mL}$).

La diversidad taxonómica obtenida en las diferentes biopelículas crecidas en BHI en este experimento fue mucho mayor que en la secuenciación anterior identificándose un total de 23 géneros repartidos en 7 filos, con lo que la baja diversidad obtenida en el primer experimento debió de derivar de una técnica de secuenciación deficiente. Sin embargo, únicamente 8 de estos géneros se encuentran en una abundancia relativa mayor

del 1% (Figura 77). Firmicutes (77,03%-99,95%), Proteobacteria (0,01%-18,53%), Fusobacteria (0,13%-2,21%), Epsilonbacteraeota (0,45%-2,13%) y Bacteroidetes (0,04%-1,04%) fueron los filos con mayor representación, pero únicamente Firmicutes estuvo presente en todas condiciones probadas. La presencia de la enzima Aii20J aumentó la abundancia de los Bacteroidetes (0,04% a 0,34%) mientras que redujo los Firmicutes (88,98% a 79,94%) en anaerobiosis.

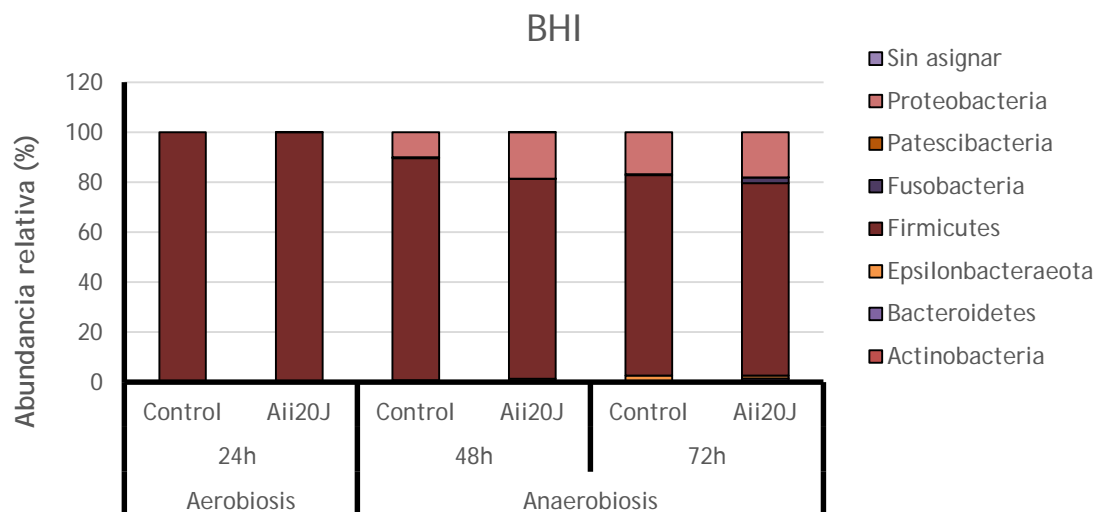


Figura 77. Filos de la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano utilizando el sistema de adhesión activa. El cultivo se realizó en el medio de cultivo BHI durante 24 h condiciones de aerobiosis, y 48 y 72 h en condiciones de anaerobiosis.

El número de géneros en las biopelículas cultivadas en BHI aumentó en condiciones de anaerobiosis, y dentro de estas muestras se incrementó con el tiempo de incubación. De esta forma, en la biopelícula en aerobiosis se encontraron 5 géneros mientras que en las biopelículas en anaerobiosis se identificaron 13 y 17 géneros para los tiempos de incubación de 48 y 72 h, respectivamente. Sin embargo, este aumento en la cantidad de géneros presentes con el número de horas de incubación, no se observó al añadir la enzima Aii20J pues se obtuvieron 19 para las 48 h y 18 géneros para 72 h.

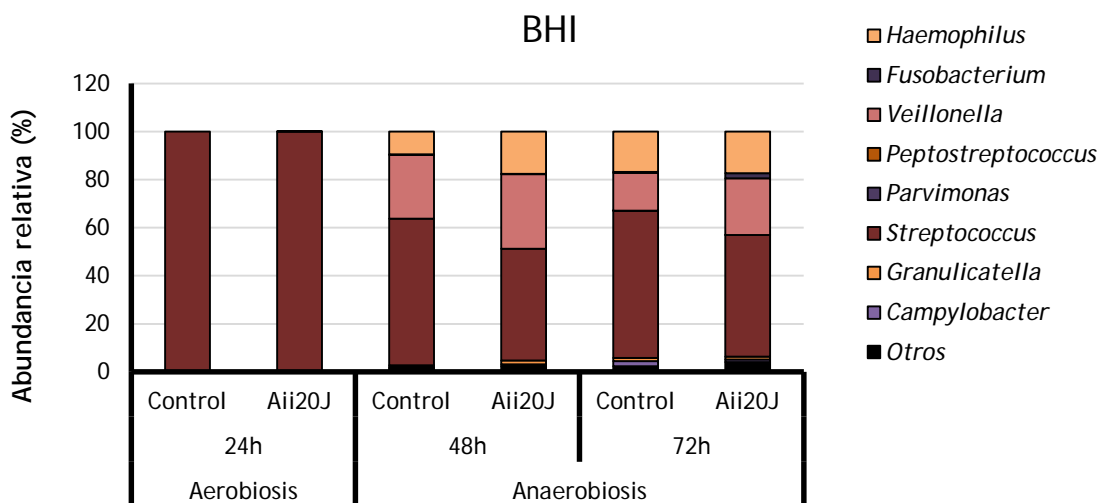


Figura 78. Composición bacteriana de la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano utilizando el sistema de adhesión activa. Se muestran aquellos géneros con una representación mayor del 1%. El cultivo se realizó en el modelo AAA en BHI en durante 24 h condiciones de aerobiosis y 48 y 72 h en condiciones de anaerobiosis.

Los miembros del género *Streptococcus* dominaron todas las condiciones realizadas en BHI (Figura 78), especialmente la de aerobiosis (99,6%). En condiciones anaeróbicas, aunque los *Streptococcus* también fueron dominantes (46%-61%), aparecieron otros géneros mayoritarios como *Veillonella* (15%-30%) o *Haemophilus* (9%-18%).

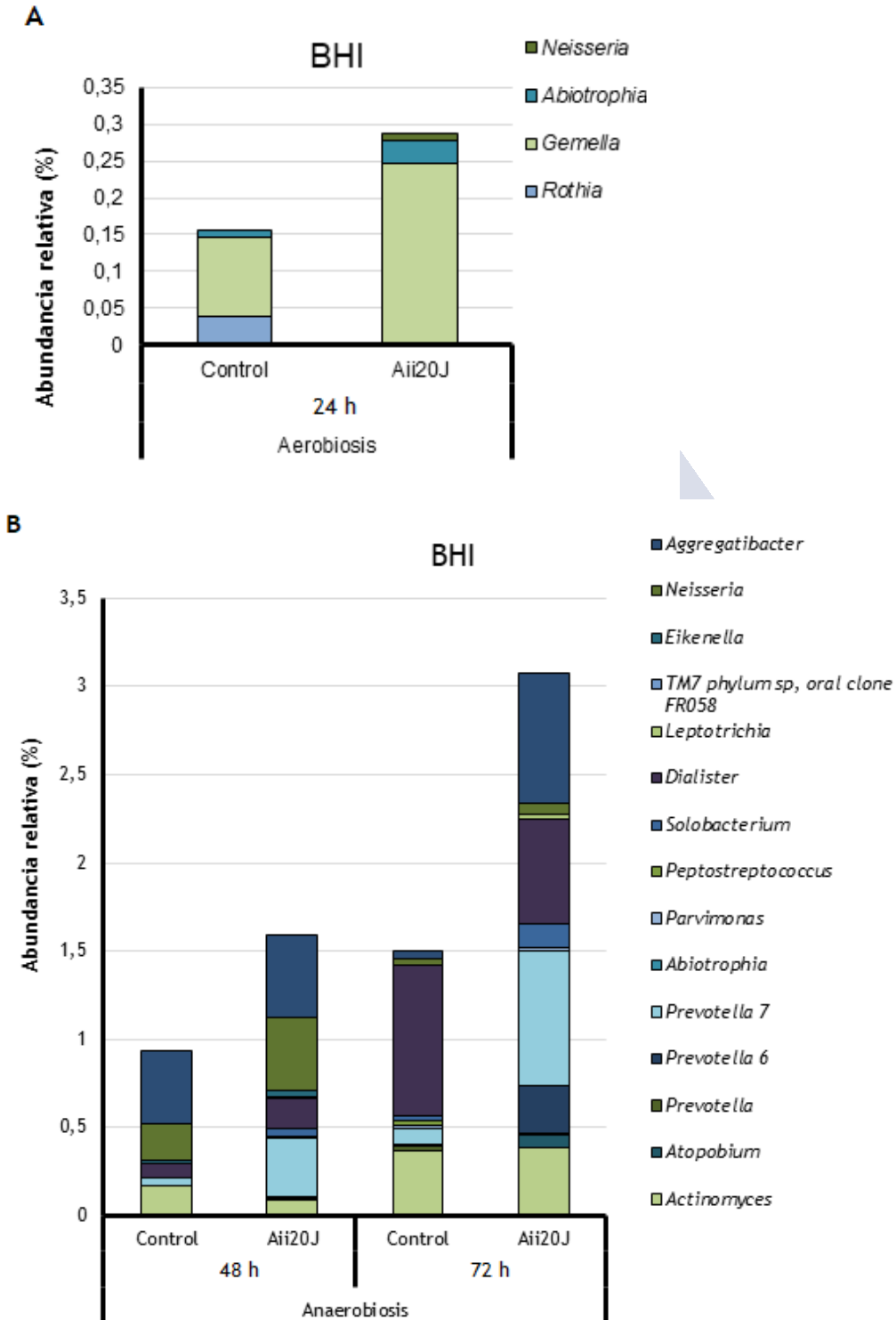


Figura 79. Composición bacteriana de la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano utilizando el sistema de adhesión activa. Se muestran aquellos géneros con una representación menor del 1%. El cultivo se realizó en el medio de cultivo BHI en durante 24 h condiciones de aerobiosis (A) y 48 y 72 h en condiciones de anaerobiosis(B).

En cuanto a los géneros menos representados, las muestras en aerobiosis (24 h) la presencia de Aii20J duplicó la cantidad de bacterias del género *Gemella* y propició la aparición del género *Neisseria* (Figura 78). La adición de la enzima Aii20J al medio de cultivo en condiciones de anaerobiosis (Figura 78) redujo la presencia de los *Streptococcus* (11%-15%) y aumentó la de *Veillonella* (4%-8%) tanto a 48 h como a 72h. En las primeras 48 horas con la enzima Aii20J se observó el descenso de *Fusobacterium* (0,27% a 0,13%) y el incremento de *Haemophilus* (9,4% a 17,6%), *Granulicatella* (0,8 a 1,48%) y *Campylobacter* (0,45% a 0,9%). En cambio, tras 72 h con la enzima Aii20J se duplicó la cantidad de bacterias del género *Parvimonas* y se produjo un gran aumento de la abundancia de *Fusobacterium* (0,37% a 2,19%). Los géneros TM7 y *Atopobium* se identificaron solo en presencia de la lactonasa mientras que *Peptostreptococcus* se encontró únicamente en el control tras 72 h de incubación (Figura 79B).

Las muestras cultivadas en Schaedler permitieron el crecimiento de hasta 8 filos diferentes, siendo Firmicutes el mayoritario en todas las condiciones (99,36%-99,96%). Aunque en una baja proporción, las Actinobacterias estuvieron presentes en todas las muestras (0,01%-0,14%). A pesar de no observarse diferencias significativas con la tinción en cristal violeta. En las primeras 48 h la adición de la enzima Aii20J aumentó la proporción de Actinobacterias (0,06% a 0,14%) y redujo la de Proteobacterias (0,05% a 0,008%). Sin embargo, este efecto no se observó para las Proteobacterias a las 72 h e incluso se invirtió para las Actinobacterias (0,14% a 0,08%), pues en este caso se observó una mayor abundancia en el control. Los filos Fusobacteria y Epsilonbacteraeota también se vieron reducidos, 3 y 20 veces respectivamente, con la adición de la enzima tras 72 horas de incubación.

Los resultados de la secuenciación de las biopelículas formadas en Schaedler mostraron la presencia de un total de 22 géneros diferentes, siendo *Streptococcus* el mayoritario (98,11%-99,92%) en todas las muestras. En la biopelícula control, se identificaron 5 géneros tanto en las muestras en aerobiosis de 24 h como en las de anaerobiosis de 48 h mientras que a las 72 h se alcanzaron 19. En cambio, con la enzima solo se identificaron 11 géneros a las 72 h. Sorprendentemente, la enzima reduce la cantidad de *Bacillus* (0,006% a 0,003%) presentes en la biopelícula crecida en Schaedler en aerobiosis durante 24 h y parece sustituir el género *Abiotrophia* (0,018% a 0%) por *Granulicatella* (0% a 0,02%). Al añadir la enzima Aii20J en anaerobiosis se observa una mayor diversidad a las 48 h con respecto al control. Sin embargo, este efecto se invierte a las 72 h donde con la enzima hay un menor número de géneros (Figura 80). Además, también afecta a la abundancia relativa de los géneros presentes, en la muestra de 72 h Aii20J redujo la presencia de *Peptostreptococcus* (0,2% a 0,003%) y *Alloprevotella* (0,03% a 0,01%) mientras que otros como *Veillonella*, *Granulicatella*, *Dialister* o *Solobacterium* desaparecieron que representaban 0,88%, 0,02%, 0,03% y 0,015%, respectivamente.

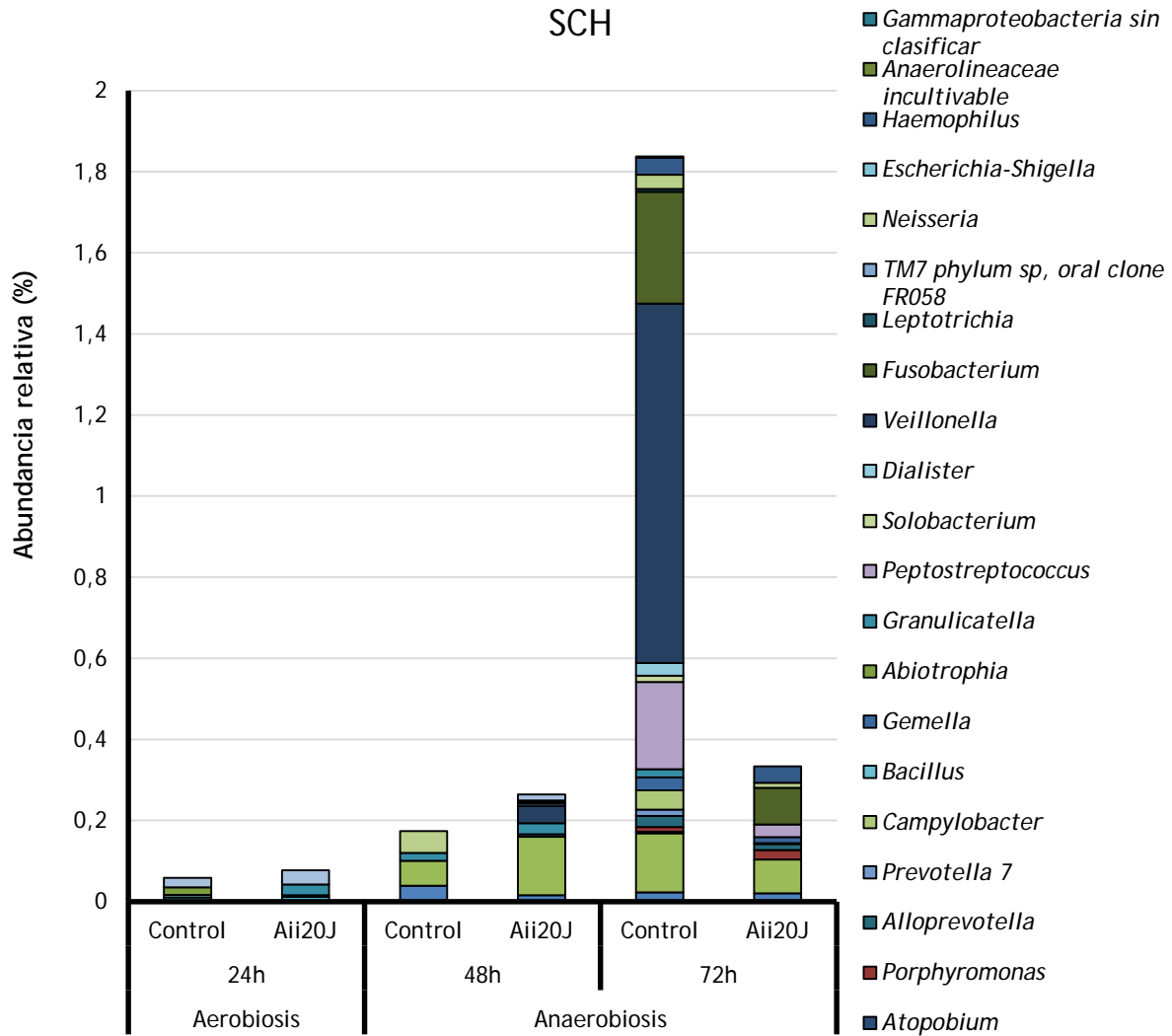


Figura 80. Composición bacteriana de la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano utilizando el sistema de adhesión activa. Se muestran los géneros presentes diferentes a *Streptococcus*. El cultivo se realizó en el medio de cultivo Schaedler en durante 24 h condiciones de aerobiosis y 48 y 72 h en condiciones de anaerobiosis.

Los resultados de la secuenciación de las biopelículas formadas en McBain mostraron la presencia de un total de 7 filos y 41 géneros diferentes (Figura 81). Los filos con mayor representación fueron Firmicutes (44,11%- 99,05%), Proteobacteria (0,79%-29,71%) Fusobacteria (10,92%-16,87%) y Bacteroidetes (0,12%-14,88%). La adición de la enzima en condiciones de aerobiosis redujo la presencia de Firmicutes (99,05% a 84,80%) mientras que aumentó las Proteobacterias (0,79% a 15,03%). En las condiciones de anaerobiosis hubo pocos cambios, como indica el análisis con componentes principales, solamente se observó un aumento de la abundancia de Patescibacteria cuando se añadió la enzima Aii20J durante las primeras 48 h (0,39%-0,60%) para luego reducirla a las 72 h (0,51%-0,25%).

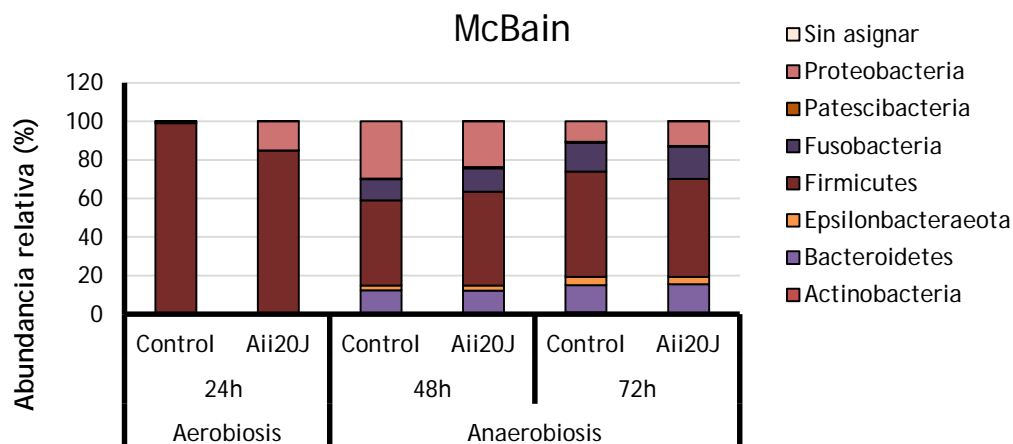


Figura 81. Filos de la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano utilizando el sistema de adhesión activa. El cultivo se realizó en el medio de cultivo BHI durante 24 h condiciones de aerobiosis, y 48 y 72 h en condiciones de anaerobiosis.

El medio de cultivo McBain fue el que permitió la mayor diversidad bacteriana, observándose el crecimiento de 12 géneros en aerobiosis (24 h), frente a los 35 y 34 géneros en anaerobiosis a las 48 h y 72 h en las biopelículas control. Al igual que en los otros medios, la adición de la enzima de QQ aumenta el número de géneros presentes en las muestras de 24 h en aerobiosis y especialmente en las de 48 h en anaerobiosis, mientras que llegadas a las 72 h de incubación parece tener el efecto contrario.

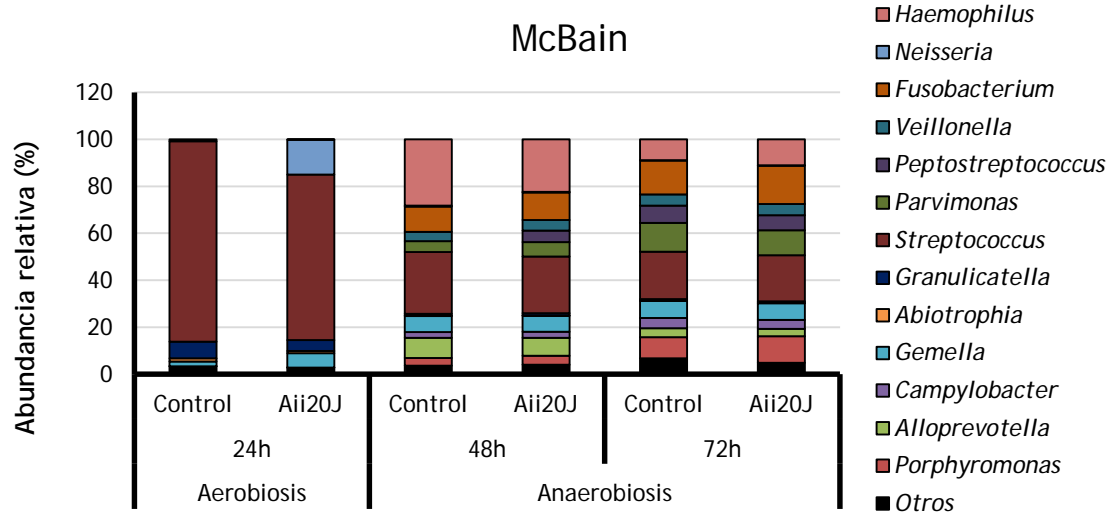


Figura 82. Composición bacteriana de la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano utilizando el sistema de adhesión activa. Se muestran los filos (A) y solo aquellos géneros con una representación mayor del 1% (B). El cultivo se realizó en el medio de cultivo McBain durante 24 h condiciones de aerobiosis y 48 y 72 h en condiciones de anaerobiosis.

Los *Streptococcus* fueron el género con mayor abundancia relativa en la mayoría de muestras (19,69%-85,41%), únicamente los miembros del género *Haemophilus* a las 48 h en anaerobiosis presentaron valores similares (22,33%-28,16%) (Figura 82). De esta forma, los *Streptococcus* dominaron claramente las muestras cultivadas en aerobiosis (70,47%-85,41%). Sin embargo, no fueron tan abundantes en las diferentes muestras anaeróbicas de 48 h (26%-24%) y 72 h (19,69%-20,12%) de incubación en las cuales aumentó la presencia de otros géneros como *Haemophilus* (8,79%-28,16%),

Fusobacterium (10,75%-16,41%), *Gemella* (6,80%-7,28%), *Alloprevotella* (3,23%-8,49%) o *Porphyromonas* (3,29%-11,22%).

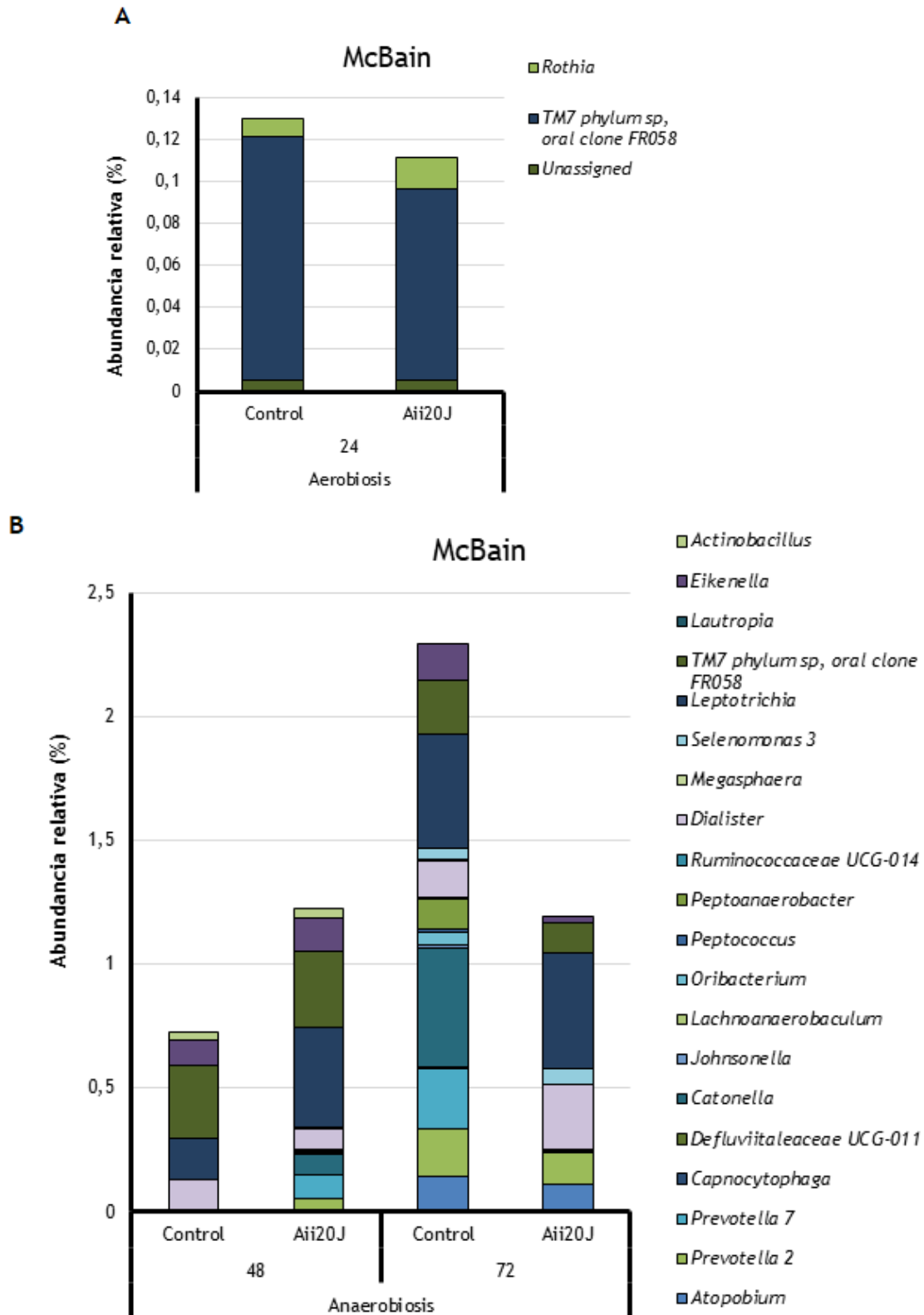


Figura 83. Composición bacteriana de la biopelícula obtenida a partir de un paciente sano utilizando el sistema de adhesión activa. Se muestran solo aquellos géneros con una representación menor del 0,5%. El cultivo se realizó en el medio de cultivo McBain durante 24 h condiciones de aerobiosis (A) y 48 y 72 h en condiciones de anaerobiosis (B).

El uso de la enzima Aii20J en la muestra cultivada en aerobiosis provocó un gran aumento de los miembros del género *Neisseria* (0,8% a 14,96%), relacionado con una salud periodontal (Yamashita y Takeshita, 2017) y una reducción del 15% en la cantidad de *Streptococcus*. Además, también duplicó la abundancia relativa del género *Gemella*. Los datos obtenidos de las muestras realizadas en anaerobiosis con y sin la enzima son muy similares en cuanto a los géneros mayoritarios (Figura 82). En cambio, en los géneros minoritarios se observa como a las 48 h hay un mayor número de ellos en presencia de la enzima y ocurre lo contrario a las 72 h, donde hay más diversidad en el control (Figura 83). Géneros como *Megasphaera* o *Prevotella* 7, que están presentes en el control de las 72 h, parece que adelantan su aparición a las 48 h en presencia de la enzima.

Se intentó establecer una posible relación entre los cambios de la composición microbiana de las biopelículas y la reducción de la biomasa causados por la enzima Aii20J (Tabla 11). Se observó que la adición de la lactonasa es capaz de reducir la cantidad de miembros del género *Streptococcus* en varias de las muestras de biopelículas formadas usando el modelo AAA, especialmente en aquellas crecidas en McBain y las cultivadas en BHI en condiciones de anaerobiosis (Tabla 11). Sin embargo, esta menor cantidad de *Streptococcus* observada al añadir la lactonasa Aii20J no se corresponde con una mayor reducción de la biopelícula pues como muestran los datos la mayor inhibición de biopelícula se obtiene en la muestra cultivada en BHI durante 24 h en aerobiosis donde apenas disminuye la proporción de *Streptococcus* un 0,12%.

Tabla 11. Efecto de la adición de Aii20J (20 µg/mL) sobre la proporción del género *Streptococcus* y la formación de biopelícula en las muestras cultivadas en los medios BHI, Schaedler (SCH) y McBain en condiciones de aerobiosis (24 h) y anaerobiosis (48 h y 72 h).

Medio de cultivo	Tiempo incubación	<i>Streptococcus</i> (%)		Inhibición biopelícula (%)
		Control	Aii20J	
BHI	24h	99,74	99,62	31,67
	48h	60,97	46,57	23,41
	72h	61,31	50,49	-
SCH	24h	99,94	99,92	-
	48h	99,82	99,73	0,04
	72h	98,11	99,64	-
McBain	24h	85,41	70,47	5,69
	48h	26,30	24,17	-
	72h	20,12	19,69	-

Discusión

Las actuales estrategias para controlar la formación de biopelículas bacterianas se basan en intentar prevenir la adhesión inicial de los microbios, utilizar enzimas que disgreguen la matriz o en matar a las células asociadas a las biopelículas. Sin embargo, una nueva estrategia contra la formación de las biopelículas que está dando prometedores resultados es la interferencia con los sistemas de QS. En los últimos años, se ha comprobado el potencial de la actividad QQ para reducir la formación de biopelículas de diferentes tipos (Lade et al., 2014; Soler et al., 2018; Mayer, 2018), incluidas aquellas que se producen dentro del área de la biomedicina (Ivanova et al., 2015; Muras et al., 2018b), y así prevenir la aparición de enfermedades infecciosas asociadas (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley y Stoodley, 2005). Sin embargo, esta estrategia ha sido poco explorada para las biopelículas orales, al no haberse podido identificar en estudios anteriores la producción de AHLs en patógenos orales (Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002), ya que la mayor parte de tecnologías QQ disponibles actúan sobre este sistema de QS.

Las diferentes biopelículas obtenidas *in vitro* en este estudio con las que se trató de comprobar la viabilidad de la aplicación de enzimas de QQ para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades orales se cultivaron en el equipo xCELLigence® System RTCA (Junka et al., 2010; Cihalova et al., 2015; Ferrer et al., 2016, Gutiérrez et al., 2016; Muras et al., 2018b) y en una modificación del modelo de adhesión activa *Active Attachment Amsterdam model* (modelo AAA) (Exterkate et al., 2010; Janus et al., 2016) llevado a cabo en el grupo de Acuicultura y Biotecnología de la Universidad de Santiago de Compostela. El uso del xCELLigence® system RTCA ya ha sido validado anteriormente para cultivos puros de bacterias (Cihalova et al., 2015; Ferrer et al., 2016, Gutiérrez et al., 2016; Capítulo 2). Aunque recientemente se ha descrito su uso para la formación de biopelículas mixtas de tipo oral (Mira et al., 2019) para la realización de este trabajo fue necesario realizar una serie de experimentos previos para la optimización del método en los cuales se probaron distintos medios de cultivo y varios tipos de inóculos. El uso del modelo AAA (modificado de Exterkate et al., 2010; Janus et al., 2016) permite el cambio de medio de cultivo sin afectar a la formación de la biopelícula y además responde a la necesidad de obtener un sistema de formación de biopelículas *in vitro* que permitiese la comparación de múltiples compuestos y concentraciones, así como diferentes medios de cultivo, tiempos de incubación y condiciones en un solo experimento. Aunque en el presente estudio solo se emplearon cubres de cristal como sustrato, en este sistema también existe la posibilidad de usar otros materiales como implantes o discos de dentina o hidroxapatita. Además, las biopelículas obtenidas con esta modificación del sistema de adherencia activa ideado en nuestro laboratorio alcanzan superficies de hasta 16,2 cm² frente a 11,3 cm² del AAA, que permiten ser analizadas macroscópicamente con diferentes metodologías. Con el objetivo de obtener una biopelícula lo más robusta posible en el modelo AAA se realizaron diferentes experimentos previos en los que se llevó a cabo una optimización metodológica. Para ello, se probaron distintos medios, condiciones y tiempos de cultivo. Durante esta etapa de optimización realizada para el modelo AAA se descartó la necesidad de que las muestras de saliva sean frescas (Figura 60) para la formación de las biopelículas *in vitro* y se confirmó el fuerte efecto del cambio de medio cada 12 h sobre la formación de la biopelícula (Figura 61). La mayor cantidad de biopelícula obtenida al realizar la renovación del medio de cultivo podría deberse a una mayor disponibilidad de nutrientes ya que dentro de la cavidad oral la saliva es una fuente continua de nutrientes, y/o eliminación de sustancias tóxicas para las bacterias orales.

La lactonasa Aii20J mostró la capacidad de inhibir las biopelícula orales de pacientes sanos cultivadas en BHI en los dos sistemas, xCELLigence® y modelo AAA, aunque parece que el modelo AAA permitió una mejor identificación de aquellas muestras en las que la enzima tiene efecto sobre la biopelícula al poder observar los cambios estructurales originados a simple vista. Ambas metodologías para la formación de biopelículas presentan limitaciones que deben de tenerse en cuenta. El xCELLigence® únicamente puede medir la biopelícula adherida al fondo del pocillo y no mide la formada en las paredes del mismo, mientras que la cuantificación con cristal violeta del modelo AAA tiñe de forma indiscriminada toda la muestra de forma que, aunque a simple vista observemos diferencias estructurales estas pueden no verse reflejadas en la cuantificación (Capítulo 2).

La enzima Aii20J muestra una clara reducción de las biopelículas formadas en el xCELLigence® a partir de muestras de saliva de pacientes sanos (30%-70%). Sin embargo, su efecto sobre las biopelículas de pacientes periodontales parece estar influenciado por la presencia de sacarosa en el medio de cultivo y lo avanzada que esté la

enfermedad periodontal. En los pacientes con enfermedad periodontal moderada la inhibición de Aii20J es mayor en presencia de sacarosa (14,06%-43,88%) que en su ausencia (58,32%-59,53%). En cambio, en un estado de la enfermedad periodontal más avanzada el uso de la enzima reduce más la biopelícula en el medio BHI (18,41%-44,35%) que cuando este se suplementa con sacarosa (39,64%-137,94%). El diferente efecto de Aii20J en estas muestras de pacientes sanos y pacientes con diferentes grados de enfermedad periodontal podría ser explicado por el cambio en la composición bacteriana de la placa dental desde una población dominada por bacterias Gram-positivas, encontradas normalmente en individuos sanos, a un aumento de las bacterias anaerobias Gram-negativas, más típicas de la periodontitis (Hojo et al., 2009).

Las biopelículas procedentes de muestras clínicas y cultivadas en BHI utilizando el modelo AAA también fueron sensibles al efecto inhibitorio de Aii20J (20-76%). Únicamente, la enzima Aii20J no tuvo efecto en aquellas muestras cuyo valor de absorbancia en la tinción con cristal violeta fue menor de 0,25, o al menos la metodología utilizada no permitió su detección. Dado que los *Streptococcus* son bacterias Gram-positivas y, por tanto, incapaces de producir AHLs, en principio no era de esperar que un enzima capaz de degradar estas señales de QS tuviera efecto inhibitorio tan significativo, mostrando una reducción del 86% sobre la biopelícula producida por este tipo de microorganismos. Estos datos indican que otras bacterias productoras de AHLs presentes en la saliva deben de tener un papel clave en la adhesión de los estreptococos como colonizadores primarios. La participación de estas bacterias Gram-negativas en la adhesión de los *Streptococcus* podría ser mediante la producción de otras señales de QS o mediante interacciones físicas. Este tipo de interacciones ha sido ya descrito para otras actividades metabólicas. El contacto célula-célula entre *P. gingivalis* y *S. gordonii*, produce una sobre-expresión de la ruta de la glicolisis en *S. gordonii* mientras que si esta se encuentra en contacto con *F. nucleatum*, es la ruta de las pentosas fosfato la que está sobre-expresada (Hendrickson et al., 2012). Además, un ambiente ácido, favorecido por la presencia de sacarosa en el medio, podría actuar también como una señal interespecie, la cual puede afectar al patrón de expresión génica de las bacterias orales (Li y Burne, 2001; Deng et al., 2007). Por ejemplo, el 14% del genoma de *S. mutans* se ve alterado a pH bajo, incluyendo los sistemas de QS (Gong et al., 2009). El hecho de que la adición de Aii20J a biopelículas monoespecíficas de *S. mutans* (Capítulo 2) no tenga efecto sobre las mismas, pero que se observe una fuerte inhibición en biopelículas orales mixtas refuerza la idea de que deben de existir bacterias productoras de AHLs esenciales en la cavidad bucal. Sin embargo, estas hipotéticas bacterias productoras de AHLs presentes en las biopelículas orales podrían necesitar de un contacto físico para activar los genes responsables de la síntesis de estas señales de QS, por lo que una baja producción de AHLs en cultivos puro de estas bacterias orales no excluye la relevancia de estos procesos. Por ejemplo, el gen A1S_0114 de *Acinetobacter baumannii* codifica para una pequeña proteína transportadora de acilos (*small acidic acyl carrier protein*, ACP) esencial para la síntesis de AHLs que es expresada a altos niveles en las biopelículas y apenas se expresa en células planctónicas (Rumbo-Feal et al., 2013), lo que conecta la adherencia celular con la expresión del QS. De igual forma, dado que la presencia de determinadas bacterias puede modificar la expresión génica de las biopelículas orales (Frias-Lopez y Duran-Pinedo, 2012) también podría ser que las bacterias orales necesiten de la interacción de otras especies microbianas para la expresión de los genes responsables de la producción de señales QS tipo AHLs.

La secuenciación de las biopelículas cultivadas en el modelo AAA, como era de esperar, mostró grandes diferencias en la diversidad bacteriana obtenida en función del medio y

de las condiciones de cultivo empleadas. El medio de cultivo McBain fue el que permitió la mayor diversidad bacteriana pues, aunque el número de filos fue similar en los tres medios de cultivo utilizados (7-8), el uso de McBain permitió el crecimiento de hasta 41 géneros distintos en las diferentes muestras mientras que el BHI y el Schaedler solo alcanzaron los 23 y 22 géneros, respectivamente. Sin embargo, todas las muestras de los distintos medios de cultivo estuvieron dominadas por miembros del filo Firmicutes (44,11%-99,96%), estando altamente representado en todas ellas el género *Streptococcus* (19,69-99,94%), especialmente en las biopelículas crecidas en Schaedler en donde la presencia de otros géneros estuvo muy restringida (0,06%-1,89%). Aparte de los *Streptococcus*, las biopelículas cultivadas en BHI presentaron altos valores de los géneros *Veillonella* (15,76%-30,98%) y *Haemophilus* (0,05%-17,62%). En cambio, en McBain hubo más variedad siendo *Haemophilus* (8,79%-28,16%), *Fusobacterium* (10,75%-16,41%), *Gemella* (6,80%-7,28%), *Alloprevotella* (3,23%-8,49%) y *Porphyromonas* (3,29%-11,22%) los géneros mayoritarios. Estos datos sobre la diversidad de bacterias orales obtenidos *in vitro* con el medio de cultivo McBain son bastante similares a los obtenidos en estudios previos donde la mayoría de secuencias identificadas obtenidas de la cavidad oral pertenecían a los géneros *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Granulicatella*, *Prevotella* y *Veillonella*, que están asociados con individuos sanos (Zaura et al., 2009; Naginyte et al., 2019). A la vista de estos datos parece que se confirma que en la composición microbiana de las biopelículas cultivadas *in vitro* influyen más los nutrientes que componen el medio de cultivo y las condiciones utilizadas que la población bacteriana de la muestra que se usa como inóculo, por lo menos en pacientes sanos como ya se ha descrito en un trabajo previo (Janus et al., 2015).

En el modelo AAA, la adición de la enzima Aii20J mostró actividad inhibitoria sobre la biopelícula formada en BHI tanto en aerobiosis como en las primeras 48 h de anaerobiosis. La gran cantidad de biomasa obtenida en el control de las 72 h de incubación provocó un desprendimiento de la misma, hecho que podría explicar que no se haya observado inhibición de Aii20J en comparación al control en este punto. En cambio, Aii20J no parece tener efecto sobre la cantidad de biopelícula formada en los otros dos medios utilizados, Schaedler y McBain, al menos cuantificada por cristal violeta. Esta diferencia observada en el efecto de Aii20J sobre las biopelículas crecidas en BHI, Schaedler y McBain podría deberse a la diferente composición bacteriana que presentan las distintas muestras en función de las condiciones ambientales (Marsh et al., 2003, 2006) y/o la metodología de medida. En el medio Schaedler Aii20J no modifica la cantidad medida por cristal violeta, pero si la diversidad. En cambio, en McBain la lactonasa cambia los géneros minoritarios cultivados en anaerobiosis 72 h (Figura 83). Habría que ver si estos cambios se producen *in vivo*, y también en salivas de otros pacientes tanto sanos como enfermos. A pesar de que la adición de la enzima Aii20J en las biopelículas cultivadas *in vitro* solo redujo la formación de aquellas en las que se utilizó BHI, modificó la diversidad microbiana presente en los tres medios de cultivo, tanto en el número de géneros presentes como en su abundancia. Tanto en BHI como en McBain, la enzima de QQ aumentó el número de géneros presentes a las 48 h en comparación con el control, pero este efecto se invirtió a las 72h de incubación. Sin embargo, en BHI los índices de Shannon de las diferentes muestras obtenidas a 24 h en aerobiosis (0,02) y para 48 y 72 h en anaerobiosis (1,05 y 1,33) fueron menores que los obtenidos al añadir Aii20J (0,03, 1,27 y 1,39), lo que indicaría una mayor diversidad bacteriana en presencia de la enzima. Este aumento en el valor del índice de Shannon en presencia de Aii20J se observó también en las muestras cultivadas en aerobiosis (0,62 a 1) y en las de 48 h en anaerobiosis (2,09 a 2,28) formadas en el medio de cultivo McBain. En cambio, la adición de Aii20J en medio Schaedler no solo no aumentó el índice de Shannon en 24 h en aerobiosis (0,01) y para

48 h en anaerobiosis (0,02), sino que redujo hasta cuatro veces dicho valor tras 72 h de incubación en anaerobiosis (0,13 a 0,03). Al contrario de lo ha descrito con el uso de compuestos de QQ en el tratamiento de aguas residuales y su efecto en la composición bacteriana (Jo et al., 2016), el uso de la lactonasa Aii20J no produjo una reducción de las Proteobacterias ni presentó una menor variación de la composición microbiana con el tiempo de incubación en los medios BHI y McBain. En cambio, cuando se utilizó el medio Schaedler para el cultivo de las biopelículas la composición microbiana si presentó comportamientos similares a los descritos previamente cuando se añadía compuestos con actividad QQ (Jo et al., 2016). Por lo tanto, el efecto de la lactonasa Aii20J y cualquier compuesto con actividad QQ parece estar condicionada por el medio de cultivo empleado ya que este tiene una mayor influencia sobre la composición bacteriana de las biopelículas *in vitro* que los microorganismos presentes en el inóculo (Janus et al., 2015).

Se observaron cambios de la composición microbiana de las biopelículas producidos por la lactonasa Aii20J independientemente de que su adición causara o no efectos en la cantidad de biopelícula formada en el modelo AAA y cuantificada por cristal violeta. En BHI, donde la adición de Aii20J redujo la formación de biopelícula de forma significativa (23,41%-31,67%) también se produjo una reducción de los *Streptococcus* en anaerobiosis tanto a las 48 h (14%) como a las 72 h (11%). Además, también se observó una reducción del 50% de la cantidad de *Fusobacterium* presente en la muestra de 48h con respecto al control (0,26% a 0,13%). La interferencia con esta bacteria oral, considerada un importante componente estructural de la placa dental ya que tiene un papel fundamental en el fenómeno de la coagregación (Zaura et al., 2009), ha sido propuesta como aproximación anti-placa al prevenir la adhesión de colonizadores tardíos de la biopelícula oral (Mira, 2018). Sin embargo, este efecto de Aii20J sobre *Fusobacterium* se revierte a las 72h produciéndose un gran aumento (0,37% a 2,19%). En el medio Schaedler, a diferencia de lo que ocurre en los otros dos medios, la enzima Aii20J apenas disminuyó la cantidad de *Streptococcus*. En este medio de cultivo, la actividad QQ de la lactonasa redujo la presencia de *Fusobacterium* (0,27% a 0,09%) y de *Peptostreptococcus* (0,2% a 0,003%) (asociada a halitosis y a enfermedad periodontal) en la muestra de 72 h mientras que otros como *Veillonella* (asociada con lesiones cariogénicas), *Granulicatella* (asociada con lesiones cariogénicas), *Dialister* (asociada con enfermedad periodontal) o *Solobacterium* (asociada con halitosis y enfermedad periodontal) desaparecieron. En el medio McBain a las 24h en presencia de la enzima, Aii20J produjo un descenso de la abundancia de los *Streptococcus* (15%) mientras que se observó un enorme incremento del género *Neisseria* (0,79%-14,96%), bacteria relacionada con un estado periodontal saludable (Yamashita y Takeshita, 2017). Se identificó la presencia del género *Porphyromonas* en las biopelículas orales cultivadas en Schaedler y en McBain. En todos los casos, se observó una mayor abundancia de este género en aquellas muestras a las que se les había añadido enzima Aii20J. En vista de los datos, el uso de compuestos con actividad QQ parece influir tanto a géneros de bacterias Gram-negativas como de Gram-positivas (Schwab et al., 2019) por lo que se necesitan más estudios que nos permitan comprender más en profundidad el modo de acción de estos compuestos en el contexto de las complejas comunidades bacterianas.

El hecho de que la lactonasa Aii20J reduzca la cantidad de biomasa y la proporción de *Streptococcus* en varias de las biopelículas parece no estar correlacionada ya que disminuye claramente la proporción de *Streptococcus* en la muestra cultivada en aerobiosis en McBain (15 %) sin afectar a la cantidad de biopelícula formada (Tabla 8). De igual forma, la mayor inhibición de biopelícula se obtiene en la muestra cultivada en BHI durante 24 h en aerobiosis donde apenas disminuye la proporción de *Streptococcus*

(99,74 a 99,62%). Por lo tanto, en las muestras cultivadas en BHI, que es donde se observa una mayor actividad anti-biopelícula por parte de Aii20J, debería de haber bacterias minoritarias que se ven afectadas por la acción de la lactonasa y aunque estén en muy baja proporción son clave en la formación de la biopelícula. En cuanto a los cambios producidos por Aii20J sobre la composición bacteriana de las biopelículas se necesitan más estudios para determinar si estos se deben a una acción directa o indirecta sobre los *Streptococcus*, sobre los cuales la enzima *a priori* no debería tener un efecto directo. Curiosamente a pesar de que Aii20J reduce, directa o indirectamente, la abundancia relativa del género *Streptococcus* también aumenta la proporción de la bacteria comensal *Streptococcus anginosus subsp. anginosus* en todas las muestras, con la única excepción de Schaedler 72 h. Debe de tenerse en cuenta que se ha sugerido la existencia de un homólogo de LuxR en *S. mutans* al encontrarse en su genoma el producto hipotético del gen *smu.46* que muestra características de la familia de estas proteínas reguladoras (Wen et al., 2011). Además, también se ha sugerido que la actividad antibiopelícula contra *S. mutans* observada en la planta *Achyranthes aspera* se deba a la presencia de un compuesto con alta similitud a OC12-HSL y que no ha sido demostrada experimentalmente (Murugan et al., 2013). En un estudio previo, el uso de un homólogo de la molécula de QS C12-HSL también mostró efectos inhibitorios sobre la biopelícula cariogénica obtenida a partir de muestras de saliva y sobre su producción de ácido láctico posiblemente mediados por la reducción de los *Streptococcus* y el aumento de *Veillonella* y *Actinobacillus* (Janus et al., 2016). A pesar de que algunas especies bacterianas han sido tradicionalmente asociadas a ciertas enfermedades, el hecho de que bacterias idénticas presenten fenotipos distintos y especies diferentes tengan fenotipos iguales (Burne et al., 2012) no solo nos indica que una única especie no puede considerarse un buen biomarcador (Simón-Soro et al., 2015) sino que también dificulta tremendamente la posibilidad de asociar una microbiota determinada a un determinado nivel de salud. Además, estudios recientes parecen indicar que el desarrollo de las enfermedades orales como la periodontitis no se producen por unos patógenos concretos, sino que se deben a cambios metabólicos y funcionales de toda la comunidad oral (Duran-Pinedo y Frias-Lopez, 2015; Yost et al., 2015; Solbiati y Frias-Lopez, 2018).

Por ello, con los datos obtenidos no se puede determinar con exactitud cómo afecta la enzima Aii20J a la patogenicidad de la biopelícula oral. Se necesitan el análisis de la composición microbiana de más individuos tanto sanos como con enfermedad periodontal, así como comprobar su efecto sobre fenotipos relacionados con estados patológicos para poder obtener alguna conclusión al respecto. Además, debe de tenerse en cuenta que en las biopelículas orales cultivadas *in vitro* los genes relacionados con la proteólisis, metanogénesis, virulencia, motilidad y quimiotaxis están sobre-representados en comparación con el inóculo del que se obtienen donde los genes sobre-representados son aquellos relacionados con el metabolismo de los carbohidratos (Naginyte et al., 2019)

Dado que las terapias convencionales para el tratamiento de las enfermedades bucodentales se basan principalmente en eliminar la placa dental mediante métodos físicos y/o químicos que permiten la colonización de nuevo por el mismo tipo de microbiota responsable de la condición patológica, el uso de enzimas de QQ que permitan modificar la composición bacteriana que evite la disbiosis previa a la enfermedad sería una nueva aproximación tremendamente interesante. Estudios recientes han propuesto el uso de las nuevas especies orales *Streptococcus* A12 (Huang et al., 2016) y *S. dentisani* (López-López et al., 2017) como bacterias probióticas por presentar actividad antimicrobiana y antiácida, lo que limitaría el crecimiento de los patobiontes. Incluso, el trasplante de microbiota oral se empieza a plantear como una futura terapia para controlar

la caries o la enfermedad periodontal, aunque aún son necesarios estudios clínicos (Nascimento, 2017). Por lo tanto, el uso de prebióticos que favorezcan la homeostasis de la cavidad bucal combinados con métodos tradicionales como dentífricos y enjuagues podrían mejorar las pautas de prevención actuales.

Los datos obtenidos en la comparativa de Aii20J con los enjuagues comerciales GingiLacer (triclosan 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Bexident Post (clorhexidina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) muestran que el efecto observable sobre la placa dental por la inactivación de los sistemas mediado por AHLs es comparable con estos colutorios antisépticos. Estos resultados muestran la viabilidad del uso del Aii20J como tratamiento alternativo para la prevención de enfermedades bacterianas orales, así como su posible uso combinado con enjuagues antisépticos (triclosán o clorhexidina). Además, bioensayos realizados para comprobar si Aii20J mantenía su actividad QQ en dos enjuagues cedidos por la empresa DENTAID demostraron la estabilidad de la lactonasa en ambos productos al menos durante 2 años cuando estos se almacenaron a 22°C. Incluso, a pesar de almacenar las formulaciones a 40°C, la enzima fue capaz de mantener su actividad lactonasa en el enjuague en uno de los colutorios durante 6 meses. A la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo, la interceptación de la comunicación bacteriana para la prevención y el tratamiento de enfermedades bacterianas orales tiene un gran potencial para aplicaciones biomédicas, desde la elaboración de enjuagues bucales al desarrollo de probióticos. De hecho, ya se ha registrado alguna patente sobre el uso de compuestos con actividad QQ para el uso en el ámbito de la salud bucodental. La compañía Colgate-Palmolive es propietaria de la patente N°US8617523 que utiliza un IQS para inhibir el crecimiento y la formación de biopelícula oral. También está la patente N°US20120189710 que se basa en una formulación con ajo que presenta actividad contra el QS, así como componentes antibacterianos y antiinflamatorios y ya se distribuye y es usada por dentistas en el Reino Unido (Grandclément et al., 2016). Además, el uso de compuestos QQ en combinación con antibióticos, antisépticos y/o un agente dispersante es una interesante estrategia a seguir para la prevención y el control de enfermedades bacterianas que ya ha demostrado gran potencial (Gupta et al., 2014). Además, se ha demostrado que el uso de análogos de AHLs en combinación con antibióticos reduce la viabilidad de las biopelículas de *P. gingivalis* en mayor medida que cuando únicamente se utiliza el antimicrobiano (Asahi et al. 2012).

En el presente estudio demostramos la importancia de las estrategias QQ y el potencial uso de la enzima Aii20J en la prevención y tratamiento de enfermedades orales bacterianas. Debido a su amplio espectro, su termoestabilidad y la alta resistencia de esta enzima no solo a los cambios de pH sino también al efecto de la proteinasa k and α -quimiotripsina (Mayer et al. 2015), las posibles aplicaciones comerciales son numerosas. Entre estas se incluirían la prevención de caries dental y la inhibición de biopelículas sobre dispositivos médicos que tendrán un fuerte impacto sobre la biomedicina y biotecnología con importantes implicaciones económicas. Sin embargo, se necesitan más estudios antes de poder utilizar esta prometedora biotecnología en la práctica clínica.



CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



1. El cribado de las bacterias cultivables de muestras del mar Mediterráneo mostró un alto porcentaje de cepas con actividad QS (20,84%) y QQ (38,24%). En QS la mayor abundancia se dio a 90 m (37,66%) en comparación con los 2000 m (4,01%), lo que se correlaciona con una menor disponibilidad de fosfato y una mayor densidad bacteriana. En cambio, en la actividad QQ se observó la tendencia contraria siendo más abundante a 2000 m (47,05%) que a 90 m (29,43%), lo que se correlaciona con la baja disponibilidad de POC en la mayor profundidad. Además, se observó una gran diferencia entre la habilidad de las cepas de degradar señales de cadena larga C12-HSL (38,24%) o cadena corta C6-HSL (1,93%) a ambas profundidades.

2. En este trabajo se identificó por primera vez la actividad QQ contra AHLs en miembros de los géneros *Citromicrobium*, *Erythrobacter*, *Planomicrobium*, *Pantoea* y *Sphingopyxis* siendo la bacteria *Sphingopyxis* sp. 2E12 y la levadura *Rhodotorula* sp. 2F1 los aislados de mayor potencial biotecnológico. Una mayor caracterización de estas cepas marinas con actividad QQ y de la enzima SphIA, subclonada recientemente a partir de *Sphingopyxis* sp. 2E12, podrá contribuir al control de infecciones bacterianas en la agricultura, acuicultura y biomedicina.

3. El análisis de los metagenomas marinos reveló una mayor prevalencia de receptores sobre las sintasas de AHLs, así como de las acilasas sobre las lactonasas. Sorprendentemente, no se identificaron secuencias homólogas de la sintasa LuxS, responsables de la producción de la señal AI-2. Aunque el claro aumento de la presencia de secuencias putativas tanto de QS y como de QQ en los metagenomas con la profundidad de la muestra podría sugerir una potencial relevancia de estos procesos en el mar, principalmente aguas profundas, debe de tenerse en cuenta que la presencia de los genes no implica la expresión de los mismos.

4. El extracto celular de *Tenacibaculum* sp. 20J, que presenta elevada actividad QQ contra AHLs procedente de la actividad lactonasa de Aii20J, también es capaz de interferir específicamente con el sistema de QS mediado por AI-2, de forma independiente a su capacidad de degradar las AHLs y reducir de forma significativa la biopelícula, tanto espesor como superficie cubierta, formada por la bacteria cariogénica *S. mutans*.

5. En este trabajo se demuestra la presencia de señales tipo AHLs en distintos tipos de muestras orales, saliva y dientes extraídos, siendo la primera vez que se describe este hecho en la bacteria patógena *P. gingivalis*, considerada como uno de los principales responsables del desarrollo de la enfermedad periodontal. La identificación de la producción de la señal OC8-HSL por *P. gingivalis* en cultivo puro se ve modificada por la presencia de otras bacterias y abre la posibilidad de utilizar las estrategias de QQ para prevenir el desarrollo de biopelículas formadas por este patógeno.

6. La identificación de AHLs en distintas muestras de saliva puso de manifiesto la gran variabilidad de estas señales en una misma persona a lo largo del tiempo. El análisis de las muestras de salivas obtenidas de diferentes pacientes mostró que las señales C14 y C18-HSL solo estuvieron presentes en aquellos que tenían caries, lo que apoyaría la posibilidad del uso de las AHLs como biomarcador para enfermedades orales bacterianas.

7. Los resultados de las bacterias orales cultivables mostraron un alto porcentaje de cepas con actividad QS (10,91%) y QQ (29,92%), aunque deben de ser confirmados, sugiriendo una mayor importancia de estos procesos mediados por AHLs que la considerada hasta el momento dentro de la cavidad bucal. Al contrario de lo observado en el QS, que fue más común en el paciente sano (15,25%) que en el periodontal (6,25%), la actividad QQ es más abundante en las muestras periodontales (37,42%) que en las del paciente sano (25,20%). El análisis de 700 genomas y 13 metagenomas orales mostró la identificación de genes relacionados con procesos de QS y QQ en el 99,27% de los

metagenomas y el 8,7% de los genomas orales lo que sugiere la potencial importancia de los procesos mediados por estas señales de QS en la cavidad oral.

8. La adición de AHLs externas a diferentes tipos de biopelículas *in vitro*: cariogénica, comensal y periodontal (Janus et al., 2015), causó importantes cambios en varios fenotipos relacionados con las patologías orales como son la producción de ácido láctico y la actividad proteasa. En concreto, la señal C6-HSL, pero no OC6C-HSL, produjo cambios significativos en la composición microbiana de la biopelícula oral pues los miembros de los géneros *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus* y *Prevotella* aumentaron su abundancia en las biopelículas periodontales. Estos datos apoyan fuertemente la idea de la potencial importancia de las AHLs en la cavidad oral.

9. El medio de cultivo McBain fue el que permitió la mayor diversidad bacteriana en las biopelículas orales cultivadas pues, aunque el número de filos fue similar en los tres medios de cultivo utilizados (7-8), el uso de este medio permitió el crecimiento de hasta 41 géneros distintos en las diferentes muestras mientras que los medios BHI y Schaedler solo alcanzaron 23 y 22 géneros, respectivamente.

10. La adición de la enzima Aii20J redujo la biopelícula oral cultivada en el medio de cultivo BHI tanto en aerobiosis como en anaerobiosis formada a partir de diferentes muestras de saliva de pacientes sanos y pacientes periodontales en los dos sistemas utilizados en el presente trabajo, el modelo de adherencia activa y xCELLigence® RTCA.

11. Los índices de Shannon de las biopelículas cultivadas en BHI en aerobiosis 24 h (0,02) y en anaerobiosis 48 y 72 h (1,05 y 1,33) fueron menores que los obtenidos al añadir Aii20J (0,03, 1,27 y 1,39), lo que indicaría una mayor diversidad bacteriana en presencia de la lactonasa. Un ligero aumento en el valor del índice de Shannon también se observó en presencia de Aii20J en las muestras cultivadas en el medio de cultivo McBain en aerobiosis (0,62 frente a 1) y en anaerobiosis 48 h (2,09 frente a 2,28), aunque no hubo efecto cuantitativo significativo de la enzima.

12. La adición de Aii20J en biopelículas cultivadas en BHI formadas a partir de saliva de un paciente sano susceptible a la enzima causó una clara disminución de los *Streptococcus* en anaerobiosis tanto a las 48 h (14%) como a las 72 h (11%) así como una reducción del 50% de la cantidad de *Fusobacterium* presente en la muestra de 48 h con respecto al control (0,26 % a 0,13%). La interferencia con *Fusobacterium*, considerada un importante componente estructural de la placa dental podría impedir la adhesión de colonizadores tardíos de la biopelícula oral. Sin embargo, este efecto de Aii20J sobre *Fusobacterium* se revierte a las 72 h produciéndose un gran aumento (0,37% a 2,19%). En el medio McBain a las 24h, Aii20J produjo un descenso de la abundancia de los *Streptococcus* (15%). En el medio Schaedler, la actividad QQ de la lactonasa redujo la presencia de *Fusobacterium* (0,27% a 0,09%) y de *Peptostreptococcus* (0,2% a 0,003%) en la muestra de 72 h mientras que otros patobiontes como *Veillonella*, *Granulicatella*, *Dialister* o *Solobacterium* desaparecieron. Es necesario confirmar estos cambios cuantitativos y cualitativos generados por la enzima con muestras de saliva de diferentes donantes con el objetivo de comprobar el potencial de esta herramienta biotecnológica para la prevención y el tratamiento de las enfermedades orales.

1. The screening of the cultivable bacteria marine from samples of the Mediterranean Sea showed a high percentage of strains with QS (20.84%) and QQ (38.24%) activity. In QS, the highest abundance was at 90 m (37.66%) compared to 2000 m (4.01%), which correlates with a lower availability of phosphate and a higher bacterial density. In contrast, the opposite trend was observed for the QQ activity, being more abundant at 2000 m (47.05%) than at 90 m (29.43%), which correlates with the low POC availability in the deeper sample. In addition, a large difference was observed between the ability of the strains to degrade long chain C12-HSL (38.24%) or short chain C6-HSL (1.93%) at both depths.

2. In this work, the QQ activity against AHLs was identified for the first time in members of the genera *Citromicrobium*, *Erythrobacter*, *Planomicrobium*, *Pantoea* y *Sphingopyxis* being the bacterium *Sphingopyxis* sp. 2E12 and the yeast *Rhodotorula* sp. 2F1 the isolates with the highest biotechnological potential. A deeper characterization of these marine strains with QQ activity and the recently cloned enzyme SphA, obtained recently from *Sphingopyxis* sp. 2E12, may contribute to the control of bacterial infections in agriculture, aquaculture and biomedicine

3. The analysis of marine metagenomes revealed a higher prevalence of AHL-receptors in comparison to AHL-synthases as well as acylases compared to lactonases. Surprisingly, homologous sequences of the LuxS synthase, responsible for the production of AI-2, were not identified. Although the clear increase of the presence of putative sequences of both QS and QQ in the metagenomes with depth of the sample could suggest a potential relevance of these processes in the sea, mainly deep waters, it should be taken into account that the presence of the genes does not imply the expression of them in the natural conditions.

4. The cell extract of *Tenacibaculum* sp. 20J, a bacterium with a wide-spectrum QQ activity against AHLs, derived from the lactonase Aii20J, is able to interfere specifically with the QS system mediated by AI-2, independently of its ability to degrade AHLs, and significantly reduced the thickness and surface area of biofilms of the cariogenic bacterium *S. mutans*.

5. This work demonstrates the presence of AHLs signals in different types of oral samples: saliva and extracted teeth, and in the pathogenic bacterium *P. gingivalis*, considered one of the main responsible of periodontal disease. The production of OC8-HSL signal by *P. gingivalis* in pure culture is modified by the presence of other bacteria and opens the possibility of using QQ strategies to prevent the development of biofilms formed by this pathogen.

6. The identification of AHLs in different oral samples showed a great variability of these signals in saliva from the same person over time. The analysis of saliva samples obtained from different patients showed that C14 and C18-HSL were only detected in those patients with dental cavities, which would support the possibility of the use of the AHLs as a biomarker for oral bacterial diseases.

7. The results of the cultivable oral bacteria showed a high percentage of strains with QS (10.91%) and QQ (29.92%) activity. Although these results must to be confirmed by additional analysis, these high percentages suggest that AHL-mediated QS processes may have a greater importance in the oral cavity than considered so far. Contrary to what is observed in the capacity to activate the QS biosensors, that is more common in the healthy patient (15.25%) than in the periodontal patient (6.25%), the QQ activity is more abundant in the periodontal sample (37.42%) than in the sample from the healthy patient (25.20%). The analysis of 700 genomes and 137 metagenomes showed the identification of genes related to QS and QQ processes in 99.27% of metagenomes and 8.7% of oral

genomes, which suggests the potential importance of the processes mediated by these QS signals in the oral cavity.

8. The addition of external AHLs to different types of biofilms in vitro: cariogenic, commensal and periodontal (Janus et al., 2015), caused important changes in several phenotypes related to oral pathologies such as lactic acid production and protease activity. In particular, C6-HSL, but not OC6-HSL, produced significant changes in the microbial composition of the oral biofilm, increasing members of the genera *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus* y *Prevotella* in periodontal biofilms. These data strongly support the idea of the potential importance of AHLs in the oral cavity.

9. The McBain culture medium was the one that allowed the highest bacterial diversity in the cultivated oral biofilms because, although the number of phyla was similar in the three culture media (7-8), the use of this medium allowed growth up to 41 different genera in the different samples while the BHI and Schaedler media only reaches 23 and 22 genera, respectively.

10. The addition of Aii20J reduced the oral biofilm grown in BHI in both aerobiosis and anaerobiosis conditions formed with different saliva samples from healthy and periodontal patients in the two biofilm systems used in the present work, the active adhesion model and the xCELLigence® RTCA.

11. The Shannon index of biofilms obtained from saliva samples from a healthy donor susceptible to Aii20J were lower when grown in BHI in aerobic conditions 24 h (0.02) and anaerobic conditions 48 h and 72 h (1.05 and 1.33), than in the presence of Aii20J (0.03, 1.27 y 1.39), which indicates a higher bacterial diversity in the presence of lactonase. This increase in the value of the Shannon index in the presence of Aii20J was also observed in the samples cultured in the McBain culture medium, in aerobiosis (0.62 versus 1) and in those of 48 h in anaerobiosis (2.09 versus 2.28), despite no significant quantitative effect of the enzyme was observed

12. The addition of Aii20J in biofilms cultured in BHI obtained using saliva samples from a healthy patient susceptible to the enzyme caused a clear decrease of *Streptococcus* in anaerobic conditions at 48 h (14%) and 72 h (11%) as well as a 50% reduction in the amount of the *Fusobacterium* present in the 48 h sample with respect to the control (0.26% to 0.13%). Interference with *Fusobacterium*, considered an important structural component of dental plaque, could prevent the adhesion of late colonizers of the oral biofilm. However, this effect of Aii20J on *Fusobacterium* reverses after 72 h, producing a large increase (0.37% to 2.19%). Aii20J also reduced the abundance of *Streptococcus* genera (15%) in anaerobic biofilm produced in McBain medium at 24 h. In the anaerobic biofilm produced with Schaedler medium, the lactonase reduced the presence of *Fusobacterium* (0.27% to 0.09%) and *Peptostreptococcus* (0.2% to 0.003%) in the 72 h samples while other pathogens such as *Veillonella*, *Granulicatella*, *Dialister* o *Solobacterium* disappeared. It is necessary to confirm these quantitative and qualitative changes generated by the enzyme with saliva samples from different donors in order to assess the potential of this biotechnological tool for the treatment and prevention of oral diseases.



RESUMEN/RESUMO/SUMMARY



NUEVOS ANTIPATOGÉNICOS: IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS BACTERIAS MARINAS CON ACTIVIDAD QUORUM QUENCHING Y APLICACIÓN EN SALUD BUCODENTAL

La placa dental es un tipo de biopelícula que se forma como resultado de la acumulación e interacción de los microorganismos adheridos a los dientes, bacterias y hongos mayoritariamente. A pesar de que se encuentra también en individuos sanos, la placa dental está considerada uno de los principales factores para que se inicie un proceso infeccioso en la boca. En estos casos se suele producir una alteración en el equilibrio de la microbiota de la cavidad bucal o disbiosis, que es el origen de enfermedades orales posteriores como la caries o la gingivitis. Para la formación de esta biopelícula oral se necesitan diferentes genes, entre los que se encuentran aquellos relacionados con la comunicación bacteriana, denominada QUORUM SENSING (QS). Por lo tanto, entender cómo se comunican las bacterias es esencial para predecir su papel dentro de las biopelículas así como su potencial impacto en la prevención y tratamiento de las diferentes infecciones bacterianas orales. Sin embargo, el papel del QS en la virulencia de los patógenos orales ha recibido poca atención hasta el momento, y esta aun ha sido menor para la microbiota comensal y las biopelículas mixtas (Ebersole et al., 2017). En patógenos orales solamente se ha descrito la presencia de señales de QS tipo AI-2 y AIP mientras que no se ha podido indentificar hasta el momento la producción de señales tipo AHLs en estas bacterias (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002). Solo se han identificado cinco cepas aisladas de la boca capaces de producir señales AHLs (Yin et al., 2012b; Chen et al., 2013; Goh et al., 2014, 2016) aunque ninguna de estas es un patógeno oral ni está considerada residente habitual de la cavidad oral.

La interceptación de la comunicación bacteriana impide, entre otros procesos, la producción de factores de virulencia y la formación de biopelículas. Este mecanismo de interferencia, conocido de forma general como QUORUM QUENCHING (QQ), constituye una interesante alternativa al uso de los antibióticos ya que al no matar al patógeno sino simplemente bloquear su virulencia (antipatogénico), no se espera que generen tantas resistencias. Existen ya algunos trabajos que han documentado la viabilidad de la inactivación del QS como medio para la prevención de enfermedades infecciosas. Sin embargo, esta estrategia ha sido poco explorada en las biopelículas orales al no haberse podido identificar en estudios previos la producción de AHLs en patógenos orales (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002).

El presente trabajo tiene dos partes claramente diferenciadas. En la primera se llevó a cabo el aislamiento de cepas marinas con potencial uso biotecnológico al presentar actividad QQ de amplio espectro. En la segunda parte se trató de determinar la existencia y la importancia del QS mediado por AHLs dentro de la cavidad oral mediante el uso de biosensores y análisis en HPLC, y la posible aplicación de estrategias de QQ frente a AHLs y AI-2 para la prevención y tratamiento de enfermedades bacterianas orales.

Dado que el medio marino es una fuente de bacterias con actividad QQ de enorme potencial, siendo las bacterias cultivables marinas mucho más abundantes y activas que en otros medios, se realizó un cribado funcional de cepas aisladas del mar Mediterráneo a 90 y a 2000 m de profundidad para detectar aquellas con potencial uso biotecnológico. Esto permitió la identificación de actividad QQ en el 38,24% de las cepas aisladas, siendo esta actividad más abundante a 2000 m (47,05%) que a 90 m (29,42%). Además, se observó una gran diferencia en la habilidad de las cepas para degradar las señales dependiendo de la longitud de su cadena, siendo mayor en el caso de las señales de cadena larga C12-HSL (38,24%) que las de cadena corta C6-HSL (1,93%). Estos datos apoyarían

la idea de que las señales de QS se pueden usar también como fuente adicional de carbono y energía en condiciones nutricionales limitantes ya que la degradación de cadenas largas contribuye más eficientemente a las reservas metabólicas de las células. En cambio, se ha encontrado una mayor abundancia de cepas productoras de AHLs en la muestra fótica de 90 m (37,66%) en comparación con la muestra de 2000 m (4,01%). Además, el análisis de metagenomas marinos obtenidos del mar Mediterráneo a diferentes profundidades, desde 15 m a 2000 m, permitió la identificación de secuencias relacionadas con QS y QQ, siendo mayor su relevancia en las muestras de 1000 m y 2000 m. La frecuencia de las enzimas de QQ fue similar a las de otros genes relacionados con el metabolismo oxidativo (*dmdA*), y con metabolismos del azufre (*dsrA* and *soxB*) y del nitrógeno (*amoC*) lo que indica una relevancia del QQ en el medio marino.

En este trabajo se identificó por primera vez la actividad QQ contra AHLs en miembros de los géneros *Planomicrobium*, *Sphingopyxis*, *Erythrobacter*, *Pantoea* y *Citromicrobium*, siendo la bacteria *Sphingopyxis* sp. 2E12 y la levadura *Rhodotorula* sp. 2F1 las cepas de mayor potencial biotecnológico. La mayor caracterización de estos aislados marinos con actividad QQ y de la enzima SphA, obtenida recientemente a partir de *Sphingopyxis* sp. 2E12, podrán contribuir al control de infecciones bacterianas en agricultura, acuicultura y biomedicina.

El sistema de comunicación bacteriana mediado por AI-2 tiene un papel muy importante en la formación de biopelícula en varios patógenos orales, incluyendo la bacteria cariogénica *S. mutans*. La cepa marina *Tenacibaculum* sp. 20J, aislada en nuestro grupo de investigación (Romero et al., 2011), mostró la capacidad de interferir específicamente con este sistema de QS de forma independiente a su capacidad de degradar las señales de AHLs (Muras et al., 2018b) afectando a la biopelícula formada por *S. mutans*. El tratamiento de la biopelícula de *S. mutans* con el extracto de *Tenacibaculum* sp. 20J mostró una reducción tanto de la superficie cubierta (50%) como del espesor (51,38%). Estudios preliminares, que incluyeron diálisis y ultracentrifugación, parecen indicar que el compuesto bioactivo del extracto de *Tenacibaculum* sp. 20J es una molécula de gran tamaño que posiblemente se encuentra asociada a membrana.

En este trabajo se demuestra la presencia de señales AHLs en distintos tipos de muestras orales, saliva y dientes extraídos, siendo la primera vez que se describe este hecho en el patógeno *P. gingivalis*. Los datos sugieren que la producción de AHLs por este patógeno se ve afectada por la presencia de otras bacterias. El co-cultivo con *S. oralis* induce en *P. gingivalis* un aumento de la cantidad de OC8-HSL (0,30 a 1,40 ng/mL). El análisis de 700 genomas y 13 metagenomas orales mostró la prevalencia de los sistemas de QS y QQ dentro de la cavidad oral, al identificar genes relacionados con estos procesos en el 99,27% de los metagenomas y el 8,7% de los genomas orales.

El cribado funcional de las bacterias orales cultivables mostró un alto porcentaje de cepas con actividad QS (10,91%), aunque debe de ser confirmado, sugiriendo una mayor importancia de estos procesos mediados por AHLs que la considerada hasta el momento dentro de la cavidad bucal. Los datos indicaron que esta actividad QS es más común en muestras de placa dental (15,33%) que en muestras de saliva (6,42%). Además, las cepas con actividad QS se encontraron con mayor frecuencia en las muestras obtenidas del paciente sano (15,25%) en comparación con las muestras del paciente periodontal (6,25%). Este estudio es el primero en describir actividad QQ contra señales de cadena corta en bacterias aisladas de la cavidad bucal. Los resultados mostraron que un gran número de estas bacterias orales (29,92%) son capaces de interferir con la señal C6-HSL, tanto las aisladas de muestras de saliva (28,14%-32,41%) como las procedentes de placa

dental (14%-46,71%). Al contrario de lo observado para la detección de las moléculas de QS donde esta actividad es más común en el paciente sano que en el paciente periodontal, la inhibición del QS fue más abundante en las muestras periodontales (37,42%) que en las muestras del paciente sano (25,20%) aunque presentaron valores bastante similares. Esta alta prevalencia de la actividad QQ en cepas orales (29,92%) es mucho mayor que la descrita para muestras de suelo (2,5%) (Dong et al., 2002), siendo parecida a los valores obtenidos para muestras de diferentes ambientes marinos (Skindersoe et al., 2008; Romero et al., 2011, 2012; Weiland-Bräuer et al., 2015; Saurav et al., 2016; Torres et al., 2013, 2016) que presentan la mayor actividad QQ descrita hasta el momento.

La adición de AHLs externas a diferentes tipos de biopelículas *in vitro*: cariogénica, comensal y periodontal (Janus et al., 2015), causó importantes cambios en varios fenotipos relacionados con las patologías orales, como son la producción de ácido láctico y la actividad proteasa. En concreto, la señal C6-HSL, pero no OC6C-HSL, produjo cambios significativos en la composición microbiana de la biopelícula oral pues los miembros de los géneros *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus* y *Prevotella* aumentaron su abundancia en las biopelículas periodontales. Estos datos apoyan fuertemente la idea de la potencial importancia de las AHLs en la cavidad oral.

Debido a que los procesos de QS controlan la formación de las biopelículas, la confirmación de la producción de señales AHLs en muestras orales y bacterias patógenas, así como su influencia sobre la composición microbiana abre una nueva vía de aproximación para la prevención y el tratamiento de enfermedades orales bacterianas. En este trabajo se demostró que el uso de compuestos con actividad QQ como la lactonasa Aii20J pueden reducir la formación de biopelículas orales cultivadas tanto en el sistema de medición a tiempo real xCELLigence® RTCA como en una modificación del sistema de adhesión activa (*Active Attachment Amsterdam mode* de Exterkate et al., 2010). Este efecto inhibitorio de Aii20J sobre biopelículas formadas a partir de muestras de saliva de un paciente sano, que está fuertemente influenciado por el medio de cultivo y las condiciones utilizadas, incrementa la diversidad de la biopelícula oral y reduce la cantidad de biomasa. A pesar de que la lactonasa Aii20J reduce la cantidad de miembros del género *Streptococcus* a favor de otros géneros dependiendo de las condiciones de cultivo utilizadas, esta modificación en la composición bacteriana parece no estar relacionada directamente con la cantidad de biopelícula formada. Sería necesario confirmar estos cambios cuantitativos y cualitativos generados por la enzima con muestras de saliva de diferentes donantes con el objetivo de comprobar el potencial de esta herramienta biotecnológica para la prevención y el tratamiento de las enfermedades orales. Debido al amplio espectro de actividad QQ de Aii20J, su termoestabilidad y la alta resistencia a cambios de pH (Mayer et al., 2015), sus posibles aplicaciones comerciales en biotecnología y biomedicina son numerosas con importantes implicaciones económicas. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre el mecanismo de acción de la enzima de QQ y los procesos de QS implicados en la formación de la placa dental y el establecimiento de las diferentes patologías antes de poder utilizar esta prometedora tecnología en la práctica clínica.



NOVOS ANTIPATOXÉNICOS: IDENTIFICACIÓN DE NOVAS BACTERIAS MARIÑAS CON ACTIVIDADE QUORUM QUENCHING E APLICACIÓN EN SAÚDE BUCODENTAL

A placa dental é un tipo de biopelícula que fórmase como o resultado da acumulación e interacción dos microorganismos adheridos aos dentes, bacterias e hongos principalmente. Aínda que tamén se atopa en individuos sans, a placa dental está considerada un dos principais factores para que se produza unha infección na boca. Nestes casos adoita producirse unha alteración no equilibrio da microbiota da cavidade bucal ou disbiose, que é a orixe das enfermidades orais posteriores coma a carie ou a xinxivite. Para a formación de esta biopelícula oral necesítanse diferentes xenes, entre os que se atopan aqueles relacionados coa comunicación bacteriana, denominada QUORUM SENSING (QS). Polo tanto, entender como se comunican as bacterias é esencial para predecir o seu papel dentro das biopelículas así como a seu potencial impacto na prevención e no tratamento de diferentes infeccións bacterianas orais. Porén, o papel do QS na virulencia dos patóxenos orais recibiu ata ao momento pouca atención, e aínda menos atención prestóuselle á microbiota comensal e ás biopelículas mixtas (Ebersole et al., 2017). Nos patóxenos orais soamente describiuse a presenza de sinais de QS tipo AI-2 e AIP mentres que aínda non se detectou a produción de sinais tipo AHLs nestas bacterias (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002). Ata agora, solamente identificáronse cinco cepas illadas da boca capaces de producir sinais AHLs (Yin et al., 2012b; Chen et al., 2013; Goh et al., 2014, 2016) aínda que ningunha delas é un patóxeno oral ou está considerada residente habitual da cavidade oral.

A interceptación da comunicación bacteriana impide, entre outros procesos, a produción de factores de virulencia e a formación de biopelículas. Este mecanismo de interferencia, coñecido de forma xeral como QUORUM QUENCHING (QQ), constitúe unha interesante alternativa ao uso dos antibióticos xa que ao non matar ao patóxeno, senon simplemente bloquear a súa virulencia (antipatoxénico), non se espera que se xeren as tan temidas resistencias. Existen xa algún traballo que documentaron a viabilidade da inactivación do QS como medio para a prevención de enfermidades infecciosas. Porén, esta estratexia foi pouco explorada nas biopelículas orais xa que non puido identificarse a produción de AHLs en patóxenos orais en estudos previos (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002).

O presente traballo ten dúas partes claramente diferenciadas. Na primeira, leveouse a cabo o illamento de cepas mariñas con potencial uso biotecnolóxico ao presentar actividade QQ de amplo espectro. Na segunda parte tratouse de determinar a existencia e a importancia do QS mediado por AHLs dentro da cavidade oral mediante o uso de biosensores e análises en HPLC, e a posible aplicación de estratexias de QQ fronte a AHLs e AI-2 para a prevención e tratamento de enfermidades bacterianas orais.

Dado que o medio mariño é unha fonte de bacterias con actividade QQ de enorme potencial, sendo as bacterias cultivables mariñas moito máis abundantes e activas que noutros medios, realizouse un cribado funcional para detectar aquelas cepas illadas do mar Mediterráneo a 90 m e a 2000 m de profundidade para detectar aquelas con potencial uso biotecnolóxico. Isto permitiu a identificación de actividade QQ no 38,24% das cepas illadas, sendo esta actividade máis abundante a 2000 m (47,05%) que a 90 m (29,42%). Ademais, observouse unha gran diferenza na habilidade das cepas para degradar sinais dependendo da lonxitude da súa cadea, sendo maior no caso dos sinais de cadea longa C12-HSL (38,24%) cas de cadea curta C6-HSL (1,93%). Estes datos apoiarían a idea de que os sinais de QS pódense usar tamén coma fonte adicional de carbono e enerxía en condicións nutricionais limitantes xa que a degradación de cadeas largas contribúe máis

eficientemente ás reservas metabólicas das células. En cambio, encontrouse unha maior abundancia de cepas produtoras de AHLs na mostra fótica de 90 m (37,66%) en comparación coa mostra de 2000 m (4,01%). Ademais, o análise de metaxenomas mariños obtidos do mar Mediterráneo a diferentes profundidades, dende 15 m a 2000 m, permitiu a identificación de secuencias relacionadas co QS e QQ, sendo maior a súa relevancia nas mostras de 1000 m e 2000 m. A frecuencia dos enzimas de QQ foi similar a doutros xenes relacionados co metabolismo oxidativo (*dmdA*), e cos metabolismos do xofre (*dsrA* and *soxB*) e do nitróxeno (*amoC*) o que indica unha relevancia do QQ no medio mariño.

Neste traballo identificouse por primeira vez a actividade QQ contra AHLs en membros dos xéneros *Planomicrobium*, *Sphingopyxis*, *Erythrobacter*, *Pantoea* e *Citromicrobium*, sendo a bacteria *Sphingopyxis* sp. 2E12 e a levadura *Rhodotorula* sp. 2F1 as cepas de maior potencial biotecnolóxico. A maior caracterización destes illados mariños con actividade QQ e da enzima SphIA, obtida recentemente a partires de *Sphingopyxis* sp. 2E12, poderán contribuir ao control de infeccións bacterianas en agricultura, acuicultura e biomedicina.

O sistema de comunicación bacteriana mediado por AI-2 ten un papel moi importante na formación de biopelícula en varios patóxenos orais, incluíndo a bacteria carioxénica *S. mutans*. A cepa mariña *Tenacibaculum* sp. 20J, illada no noso grupo de investigación (Romero et al., 2011), mostrou a capacidade de interferir especificamente con este sistema de QS de forma independente da súa capacidade de degradar os sinais AHLs (Muras et al., 2018b) afectando á biopelícula formada por *S. mutans*. O tratamento da biopelícula de *S. mutans* co extracto de *Tenacibaculum* sp. 20J mostrou unha redución tanto da superficie cuberta (50%) como do espesor (51,38%). Estudos preliminares, que incluíron diálise e ultracentrifugación, parecen indicar que o composto bioactivo do extracto de *Tenacibaculum* sp. 20J é unha molécula de gran tamaño que posiblemente atópase asociada a membrana.

Neste traballo demostrouse a presenza de sinais AHLs en distintos tipos de mostrar orais, saliva e dentes extraídos, sendo a primeira vez que se describe este feito no patóxeno *P. gingivalis*. Os datos suxiren que a produción de AHLs neste patóxeno vese afectada pola presenza doutras bacterias. O co-cultivo con *S. oralis* induce en *P. gingivalis* un aumento da cantidade de OC8-HSL (0,30 a 1,40 ng/mL). O análise de 700 xenomas e 13 metaxenomas orais mostrou a prevalencia dos sistemas de QS e QQ dentro da cavidade oral, ao identificar xenes relacionados con estes procesos no 99,27% dos metaxenomas e o 8,7% dos xenomas orais.

O cribado funcional das bacterias orais cultivables mostrou un alto porcentaxe de cepas con actividade QS (10,91%), aínda deben de ser confirmados, suxerindo unha maior importancia destes procesos mediados por AHLs que a considerada ata o momento dentro da cavidade bucal. Os datos indicaron que esta actividade QS é máis común en mostras de placa dental (15,33%) que en mostras de saliva (6,42%). Ademais, as cepas con actividade QS atopáronse con maior frecuencia nas mostras obtidas do paciente san (15,25%) en comparación coas mostras do paciente periodontal (6,25%). Este estudio é o primeiro en describir actividade QQ contra sinais de cadea corta en bacterias illadas da cavidade bucal. Os resultados amosaron que un gran número destas bacterias orais (29,92%) son capaces de interferir co sinal C6-HSL, tanto as illadas de mostras de saliva (28,14%-32,41%) coma as procedentes de placa dental (14%-46,71%). Ao contrario do observado para a detección de moléculas de QS onde esta actividade é máis común no paciente san que no paciente periodontal, a inhibición do QS foi máis abundante nas

mostras periodontais (37,42%) que nas mostras de paciente san (25,20%) aínda que presentaron valores bastante similares. Esta alta prevalencia da actividade QQ en cepas orais (29,92%) é moito maior que a descrita para mostras de chan (2,5%) (Dong et al., 2002), sendo parecida aos valores obtidos para mostras de diferentes ambientes mariños (Skindersoe et al., 2008; Romero et al., 2011, 2012; Weiland-Bräuer et al., 2015; Saurav et al., 2016; Torres et al., 2013, 2016) que presentan a maior actividade QQ descrita ata o momento.

A adición de AHLs externas a diferentes tipos de biopelículas *in vitro*: carioxénica, comensal e periodontal (Janus et al., 2015), causou importantes cambios en varios fenotipos relacionados cas patoloxías orais, como son a produción de ácido láctico e a actividade proteasa. En concreto, o sinal C6-HSL, mais non OC6C-HSL, produciu cambios significativos na composición microbiana da biopelícula oral pois membros dos xéneros *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus* y *Prevotella* aumentaron a súa abundancia nas biopelículas periodontais. Estes datos apoian fortemente a idea da potencial importancia das AHLs na cavidade oral.

Debido a que os procesos de QS controlan a formación das biopelículas, a confirmación da produción de sinais AHLs en mostras orais e bacterias patóxenas, así coma a súa influencia sobre a composición microbiana abre unha nova vía de aproximación para a prevención e o tratamento de enfermidades orais bacterianas. Neste traballo demostrouse que o uso de compostos con actividade QQ coma a lactonasa Aii20J poden reducir a formación de biopelículas orais cultivadas tanto no sistema de medición a tempo real xCELLigence® RTCA como nunha modificación do sistema de adhesión activa (*Active Attachment Amsterdam mode* de Exterkate et al., 2010). Este efecto inhibitorio de Aii20J sobre biopelículas formadas a partires de mostras de saliva dun paciente san, que está fortemente influenciado polo medio de cultivo e as condicións utilizadas, incrementa a diversidade da biopelícula oral e reduce a cantidade de biomasa. A pesar de que a lactonasa Aii20J reduce a cantidade de membros do xénero *Streptococcus* a favor doutros xéneros dependendo das condicións de cultivo utilizadas, esta modificación na composición bacteriana parece non estar relacionada directamente coa cantidade de biopelícula formada. Sería necesario confirmar estes cambios cuantitativos e cualitativos xerados pola enzima con mostras de saliva de diferentes doantes co obxectivo de comprobar o potencial desta ferramenta biotecnolóxica para a prevención e o tratamento das enfermidades orais. Debido ao amplo espectro de actividade QQ de Aii20J, a súa termoestabilidade e a súa alta resistencia a cambios de pH (Mayer et al., 2015), as súas posibles aplicacións comerciais en biotecnoloxía e biomedicina son numerosas con importantes implicacións económicas. Sen embargo, necesítanse máis estudos sobre o mecanismo de acción da enzima de QQ e os procesos de QS implicados na formación da placa dental e no establecemento das diferentes patoloxías antes de poder utilizar esta prometedora tecnoloxía na práctica clínica.



NEW PATHOGENICS: IDENTIFICATION OF NEW MARINA BACTERIA WITH QUORUM QUENCHING AND APPLICATIONS EN ORAL HEALTH

Dental plaque is a type of biofilm formed as the result of the accumulation and interaction of microorganisms attached to teeth, mainly composed by bacteria and fungi in lower proportion. Although the dental plaque is also present in healthy patients it is considered one of the main factors to initiate an infectious process in the mouth. In these cases, an alteration of the oral microbiota or dysbiosis usually occurs, which is the origin of the oral diseases such as dental cavities or gum diseases. The formation and maturation of biofilm requires the expression of specific genes, including those related with the process of bacterial communication, known as QUORUM SENSING (QS). Therefore, understanding how the bacterial communicate is essential to predict their role in the biofilms as well as their potential impact in the prevention and treatment of different oral infectious diseases. However, the role of QS in the virulence of the oral pathogens has received little attention and even less is known about these processes in commensal microbiota (Ebersole et al., 2017). The presence of the QS signals AI-2 and AIP has been described in oral pathogens; meanwhile the identification of AHLs has not been so far possible in these bacteria (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002). Until now, only five AHL-producing bacteria isolated from the mouth were identified (Yin et al., 2012b; Chen et al., 2013; Goh et al., 2014, 2016), although none of them is an oral pathogen or is considered a normal resident of the oral cavity.

The interception of the bacterial communication processes prevents, among other processes, the production of virulence factors and biofilm formation. This mechanism of interference, generically known as QUORUM QUENCHING (QQ), is an interesting alternative or synergic strategy to the use of antibiotics use since it does not kill the pathogen, and therefore, the appearance of resistances is less probable. Several works have already reported the viability of the QS inactivation in order to prevent infectious diseases. However, the knowledge on the use of this approach against oral biofilms is very limited, mainly due to the impossibility to identify the AHL production in oral pathogens (Whittaker et al., 1996; Frias et al., 2001; Burgess et al., 2002), since most effective QQ strategies are directed against these QS signals.

This work has two clearly differentiated sections. In the first one, the isolation of marine strains with biotechnological potential uses due to their QQ wide-spectrum activity was pursued. In the second one, the existence and the importance of the AHL QS-mediated inside the oral cavity was determined using bioassays and HPLC methods. Additionally, the potential application of QQ strategies against AI-2 and AHLs to prevent and treat oral infectious diseases was explored in vitro using different biofilm models.

Since the marine environment is a source of bacteria with QQ activity of enormous potential, being much more abundant and active than in other media, a functional screening of strains isolated from the Mediterranean Sea at 90 and 2000 m depth was performed to detect those with potential biotechnological uses. This allowed the identification of QQ activity in 38,24% of the isolated strains, being this activity more abundant at 2000 m (47.05%) than at 90 m (29.42%). Moreover, a great difference was observed in the ability of the strains to degrade the signals depending on the length of their chain, being higher for the long signal C12-HSL (38.24%) than for the short chain signal C6-HSL (1.93%). These data would support the idea that QS signals can also be used as an additional source of carbon and energy in carbon limiting conditions since the degradation of long chain contributes more efficiently to the metabolic reserves of the cells. In contrast, a higher abundance of AHL-producing strains was found in the photic

sample of 90 m (37.66%) compared to the 2000 m (4.01%). Additionally, the analysis of the marine metagenomes obtained at the same sampling point from the Mediterranean Sea at different depths, from 15 m and to 2000 m, allowed the identification of a high number of sequences related to QS and QQ, with greater relevance in the 1000 m and 2000 m samples. The frequency of QQ enzymes was similar to other genes related to oxidative metabolism (*damA*), and with sulfur (*dsrA* and *soxB*) and nitrogen (*amoC*) metabolisms, suggesting a relevance of QQ in the marine environment.

In this work, QQ activity against AHLs was identified for the first time in marine members of the genera *Planomicrobium*, *Sphingopyxis*, *Erythrobacter*, *Pantoea* y *Citromicrobium*, being the bacteria *Sphingopyxis* sp. 2E12 and the yeast *Rhodotorula* sp. the strains with best biotechnological potential. A deep characterization of these QQ marine bacteria and the recently cloned AHL-lactonase SphiA from *Sphingopyxis* sp. 2E12 may contribute to the control of bacterial infections in agriculture, aquaculture and biomedicine.

The bacterial communication system mediated by AI-2 plays a very important role in the formation of biofilm in several oral pathogens, including the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. The marine strain *Tenacibaculum* sp. 20J, isolated by our research group (Romero et al., 2011), has the ability to interfere specifically with the AI-2 mediated QS system independently of its ability to degrade AHLs signals (Muras et al., 2018b). The treatment of the biofilm of *S. mutans* with the extract of *Tenacibaculum* sp. 20J showed a reduction of both the covered area (50%) and the thickness (51.38%) without affecting growth. Preliminary studies seem to indicate that the bioactive compound of the 20J extract is a large molecule that is possibly associated with the membrane.

In this work we demonstrated for the first time the presence of AHLs signals in different types of oral samples: saliva and extracted teeth, and in the culture medium of the pathogenic bacterium *P. gingivalis*. The data suggest that the production of AHLs by this bacterium is affected by the presence of other bacteria. The co-culture with *S. oralis* induces in *P. gingivalis* an increase in the amount of OC8-HSL (from 0,30 ng/mL to 1.40 ng/mL). The analysis of 700 genomes and 13 oral metagenomes also showed the prevalence of QS and QQ systems within the oral cavity, allowing to identify genes related to these processes in 99.27% of metagenomes and 8.7% of oral genomes.

The functional screening of oral cultivable bacteria showed a high percentage of strains with QS activity (10.91%). Although this capacity has to be confirmed with additional analysis, this data suggests a higher relevance of the QS processes mediated by AHLs within the oral cavity that considered so far. The data indicate that this QS activity is more common in dental plaque samples (15.33%) than in saliva samples (6.42%). In addition, the strains with QA activity were found more frequently in the samples obtained from the healthy patient (15.25%) compared to the samples from the periodontal patient (6.25%). This study is the first to describe the QQ activity against short chain AHLs in bacteria isolated from the oral cavity. The results showed that a large number of these oral bacteria (29.92%) are able to interfere with C6-HSL, both those isolated from saliva samples (28.14%-32.41%) and those isolated from dental plaque (14%-46.71%). Contrary to what was observed for the detection of QS activity which is more common in the healthy patient than in the periodontal patient, the QQ was more abundant in the periodontal samples (37.42%) than in the samples of the healthy patient (25.20%) although they presented similar values. This high prevalence of QQ activity in oral strains (29.92%) is much higher that described for soil samples (2.5%) (Dong et al., 2002), being similar to

the values obtained from samples of different marine environments (Skindersoe et al., 2008; Romero et al., 2011, 2012; Weiland-Bräuer et al., 2015; Saurav et al., 2016; Torres et al., 2013, 2016) that shows the higher QQ activity reported so far.

The addition of external AHLs to different types of in vitro biofilm models: cariogenic, commensal and periodontal (Janus et al., 2015), caused important changes in several phenotypes related to oral pathologies, such as lactic acid production and protease activity. In particular, the addition of C6-HSL, but not OC6-HSL, produced significant changes in the microbial composition of the oral biofilms, as members of the genera *Alloprevotella*, *Peptrostresptococcus* and *Prevotella* increased their abundance in periodontal biofilms. These data strongly support the idea of the potential importance of AHLs in the oral cavity.

Because the processes of QS control the biofilm formation, the confirmation of the production of AHL signals in oral samples and pathogenic oral bacteria, as well as their influence on the microbial composition, opens a new approach for the prevention and treatment of bacterial oral diseases. In this work, it was demonstrated how the use of compounds with QQ activity such, as the enzyme Aii20J, can reduce the formation of oral biofilm both in the xCELLigence® RTCA real-time measurement system and in a modification of the active adhesion system (Active Attachment Amsterdam model by Exterkate et al., 2010).

The inhibitory effect of Aii20J on biofilms formed from saliva samples from a healthy donor appears to be related to the microbial composition, which is strongly influenced by the culture medium and conditions used. Although the addition of the enzyme reduces the number of members of the genus *Streptococcus* in favor of the other genera depending on the culture conditions used, this modification in bacterial composition does not appear to be directly related to the amount of the biofilm formed. It is necessary to confirm these quantitative and qualitative changes generated by the enzyme with saliva samples from different donors in order to assess the potential of this biotechnological tool for the treatment and prevention of oral diseases. Due to the wide QQ activity spectrum of Aii20J, and other interesting characteristics such as thermoresistance and the high resistance to pH changes (Mayer et al., 2015), its possible commercial applications in biotechnology and biomedicine are numerous with important economic implications. However, more studies are needed before this promising technology can be used in the clinical practice.





BIBLIOGRAFÍA



- Abraham, W.R. 2006. Controlling biofilm of Gram-Positive pathogenic bacteria. *Curr. Med. Chem.* 13: 1509-1524.
- Acinas, S.G., Antón, J., Rodríguez-Valera, F. 1999. Diversity of Free-Living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 514–522.
- Afriat, L., Roodveldt, C., Manco, G., Tawfik, D.S. 2006. The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase. *Biochemistry.* 45: 13677–13686.
- Allaire, J.J., Homer, J., Marti, V., Porte, N., 2014. Markdown Renderint for R. R package version 0.7.4.
- Allison, D.G. 2003. The biofilm matrix. *Biofouling.* 19: 139-150.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Scheleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 95: 143-169.
- Anderson, A.C., Rothballer, M., Altenburguer, M.J., Woelberg, J.P., Karygianni, L., Lagkouvardos, I., Hellwing, E., Al-Ahmad, A. 2018. In-vivo shift of the microbiota in oral biofilm in response to frequent sucrose consumption. *Sci. Reports.* 8: 14202.
- Arrivet, B.A., Fiester, S.E., Ream, D.C., Centrón, D., Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., Actis, L.A. 2015. Draft genome of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain A155 clinical isolate. *Genoms Announc.* 3: e00212-15.
- Asahi, Y., Noiri, Y., Igarashi, J., Asai, H., Suga, H., Ebisu, S. 2010. Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodont Res.* 45:255-261.
- Asahi, Y., Noiri, Y., Igarashi, J., Suga, H., Azakami, H., Ebisu, S. 2012. Synergistic effects of antibiotics and an N-acyl homoserine lactone analog on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 112: 404-411.
- Atkinson, S., Williams, P. 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface* 6: 959-978.
- Augustine, N., Kumar, P., Thomas, S. 2010. Inhibition of *Vibrio cholerae* biofilm by AiiA enzyme produced from *Bacillus* spp. *Arch. Microbiol.* 192(12):1019-1022.
- Bai, J.A., Rai, V.R. 2016. Effect of small chain N acyl homoserine lactone quorum sensing signals on biofilms of food-borne pathogens. *J Food Sci Technol.* 53:3609-3614.
- Barber, C.E., Tan, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Wiilson, T.J., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P., Daniels, M.J. 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* 24: 555-566.
- Barbieri, D.S.V., Tonial, F., Lopez, P.V.A., Sales Maia, B.H.L.N., Santos, G.D., Ribas, M.O., Glienke, C., Vicente, V.A. 2014. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 59:887-896.
- Barnabe, M., Saraceni, C.H.C., Dutra-Correa, M., Suffredini, I.B. 2014. The influence of Brazilian plant extracts on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Appl Oral Sci.* 22:366-372.
- Barriuso, J., Martínez, M.J. 2018. In silico analysis of the quorum sensing metagenome in environmental biofilm samples. *Front. Microbiol.* 9: 1243.

- Bassler, B. L., Losick, R. 2006. Bacterially speaking. *Cell*. 125: 237-246.
- Batista, M.T., Souza, R.D., Ferreira, E.L., Robinette, R., Crowley, P.J., Rodrigues, J.F., Brady, L.J., Ferreira, L.C.S., Ferreira, R.C.C. 2014. Immunogenicity and invitro and in vivo protective effects of antibodies targeting a recombinant form of the *Streptococcus mutans* P1 surface protein. *Infect. Immun.* 82: 4978-4988.
- Bebrone, C. 2007. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 74. 1686-1701.
- BEG (Boletín epidemiológico de Galicia). 2011. A saúde bucodental dos escolares galegos no ano 2010. 23:1-5.
- 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.
- Benítez-Páez, A., Belda-Ferre, P., Simón-Soro, A., Mira, A. 2014. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BCM Genomics.* 15: 311.
- Bergonzi, C., Schwab, M., Elias, M. 2016. The quorum-quenching lactonase from *Geobacillus caldoxyliticus*: purification, characterization, crystallization and crystallographic analysis. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 72: 681-686.
- Bergonzi, C., Schwab, M., Naik, T., Daudé, D., Chabrière, E., Elias, M., 2018. Structural and biochemical characterization of AaL, a quorum quenching lactonase with unusual kinetic properties. 8. 11262.
- Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Müller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Shipper, C., Hornung, C., Szesny, M., Grond, S., Thürmer, A., Brzusiewicz, E., Daniel, R., Dierking, K., Schulenburg, H., Streit, W.R. 2011. A novel metagenomics short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 6: e26278.
- Biswa, P., Doble, M. 2013. Production of acylated homoserine lactone by gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS Microbiol Lett* 343:34-41.
- Blair, W.M., Doucette, G.J. 2013. The *Vibrio harveyi* bioassay used routinely to detect AI-2 quorum sensing inhibition is confounded by inconsistent normalization across marine matrices. *J. Microbiol. Methods.* 92, 250-252.
- Bobadilla Fazzini, R.A., Skindersoe, M.E., Bielecki, P., Puchatka, J., Givskov, M., Martin dos Santos V.A.P. 2012. Protoanemonin: a natural quorum sensing inhibitor that selectively activates iron starvation response. *Environ. Microbiol.* 15: 111-120.
- Boettiger, C. 2015. knitr: Citations for knitr markdown files. R package version 1.0.5.
- Bradshaw, D.J., Marsh, P.D. 1994. Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. *Caries. Res.* 28: 251-256.
- Brameyer, S., Bode, H.B., Heermann, R. 2015. Languages and dialects: Bacterial communication beyond homoserine lactones. *Trends Microbiol.* 23: 521–523.
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods.* 12: 59–60.
- Burgess, N.A., Kirke, D.F., Williams, P., Winzer, K., Hardie, K.R., Meyers, N.L., Aduse-Opoku, J., Curtis, M.A., Cámara, M. 2002. LuxS-dependent quorum sensing in

Porphyromonas gingivalis modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology*. 148:763-772.

Burne, R.A., Zeng, L., Ahn, S.J., Palmer, S.R., Liu, Y., Lefebure, T., Stanhope, M.J., Nascimento, M.M. 2012. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. *Adv. Dent. Res* 24: 77-80.

Bzdrenga, J., Daudé, D., Rémy, B., Jacquet, P., Plener, L., Elias, M., Chabrière. 2016. Biotechnological applications of quorum quenching enzymes. *Chem. Biol. Interact.* 267: 104-115.

Cai, X., Yu, M., Shan, H., Tian, X., Zheng, Y., Xue, C., Zhang, X.H. 2018. Characterization of a novel N-acylhomoserine lactonase RmmL from *Ruegeria mobilis* YJ3. *Marine Drugs*. 16: 370.

Callahan, B.J., McMuerdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Jonhson, A.J., Holmes, S.P. 2016. DADA2: High-resolution sample interference from Illumina amplicon data. *Nat. methods*. 13: 581-583.

Camelo-Castillo, A., Benítez-Paez, A., Belda-Ferre, P., Cabrerar-Rubio, R. Mira, A. 2014. *Streptococcus dentisani* sp. nov, a novel member of the mitis group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 60-65.

Campagna, S.R., Gooding, R.J., May, A.L. 2009. Direct quantification of the quorum sensing signal, Autoinducer-2, in clinically relevant samples by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 81, 6374-6381.

Camps, J., Pujol, I., Ballester, F., Joven, J., Simó, J.M. 2011. Paraoxonases as potential antibiofilm agents: their relationship with quorum-sensing signals in Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55: 1325-1331.

Cao, Y., He, S., Zhou, Z., Zhang, M., Mao, W., Zhang, H., Yao, B. 2012. Orally Administered Thermostable N-Acyl Homoserine Lactonase from *Bacillus* sp. Strain AI96 Attenuates *Aeromonas hydrophila* Infection in Zebrafish. *Appl. Environ. Microbiol. Applied*. 78: 1899–1908.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonals, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. 7: 335-336.

Carlier, A., Faure, D., Latour, X., Uroz, S., Fray, R., Smadja, B., Dessaux, Y. 2003. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4989-4993.

Case, R., Labbate, M., Kjelleberg, S. 2008. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J.* 2, 345-349.

Cases, I., de Lorenzo, V., Ouzounis, C.A. 2003. Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *Trends Microbiol.* 11: 248-253.

Chen, B., Cao, X., Lu, H., Wen, P., Qi, X., Chen, S., Wu, L., Li, C., Zhao, G. 2018. N-(3-oxo-acyl) homoserine lactone induced germ cell apoptosis and suppressed the over-activated RAS-MAPK tumorigenesis via mitochondrial-dependent ROS in *C. elegans*. *Apoptosis*. 23: 626-640.

Chen, C.N., Chen, C.J., Liao, C.T., Lee, C.Y. 2009. A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is *N*-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity. *BMC Microbiol.* 9: 89.

Chen, J.W., Chin, S., Tee, K.K., Yin, W.F., Choo, Y.M., Chan, K.G. 2013. *N*-acyl homoserine lactone-producing *Pseudomonas putida* strain T2-2 from human tongue surface. *Sensors.* 13: 13192-13203.

Chen, R., Zhou, Z., Cao, Y., Bai, Y., Yao, B. 2010. High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microb. Cell Fact.* 9:39.

Chhabra, S. R., Stead, P., Bainton, N. J., Salmond, G. P., Stewart, G. S., Williams, P., Bycroft, B. W. 1993. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone. *J. Antibiot. (Tokyo)* 46: 441-454.

Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., Nester, E.W. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 3672–3676.

Choo, J.H., Rukayadi, Y., Hwang, J.K. 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 637-641.

Chow, J.Y., Wu, L., Yew, W.S. 2009. Directed evolution of a quorum-quenching lactonase from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry.* 48: 4344–4353.

Chow, J.Y., Xue, B., Lee, K.H., Tung, A., Wu, L., Robinson, R.C., Yew, W.S. 2010. Directed evolution of a thermostable quorum-quenching lactonase from the amidohydrolase superfamily. *J. Biol. Chem.* 285: 40911–40920.

Chowdhary, P. K., Keshavan, N., Nguyen, H. Q., Peterson, J. A., Gonzales, J. E., Haines, D. C. 2007. *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry* 46: 14429-14437.

Christensen, S., Rasmussen, L., Leick, V., Wheatley, D. N. 1998. Signalling in unicellular eukaryotes: regulation of cell survival, proliferation, differentiation, mating, chemosensory behaviour, and programmed cell death. *Int. Rev. Cytol.* W: 181-253.

Chu, W., Lu, F., Zhu, W., Kang, C. 2011. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. *J. Appl. Microbiol.* 110: 202–208.

Chun, C. K., Ozer, E. A., Welsh, M. J., Zabner, J., Greenberg, E. P. 2004. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3587-3590.

Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W., Chun, J. 2007. EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2259–2261.

Cicirelli, E.M., Williamson, H., Tait, K., Fuqua, C. 2008. Acylated homoserine lactone signalling in marine bacterial systems. En: *Chemical communication among bacteria*. Editor. Winans, S.C; Bassler, B.L. Washington D.C. ASM Press. 251-271.

Cihalova, K., Chudobova, D., Michalek, P., Moullick, A., Guran, R., Kopel, P., Adam, V., Kizek, R. 2015. *Staphylococcus aureus* and MRSA growth and biofilm formation after treatment with antibiotics and SeNPs. *Int J Mol Sci.* 16:24656-24672.

Ciric, L., Pratten, J., Wilson, M., Spratt, D. 2010. Development of a novel multi-triplex qPCR method for the assessment of bacterial community structure in oral populations, *Environ. Microbiol. Rep.* 2:770-774.

Cirou, A., Mondy, S., An, S., Charrier, A., Sarrazin, A., Thoison, O., DuBow, M., Faure, D. 2012. Efficient biostimulation of native and introduced quorum-quenching *Rhodococcus erythropolis* populations is revealed by a combination of analytical chemistry, microbiology, and pirosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 481-492.

Clare, A.S. 1996. Marine natural products antifoulants: status and potential. *Biofouling.* 10: 141-159.

Conrads, G., Bockwoldt, J.A., Kniebs, C., Abdelbary, M.M.H. 2018. Commentary: Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: the case of *Streptococcus dentisani*. *Front. Microbiol.* 9: 340.

Costalonga, M., Herzberg, M.C. 2014. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal diseases and caries. *Immunol. Lett.* 162: 22-38.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318-1322.

Cude, W., Buchan, A. 2013. Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the *Roseobacter* clade: complex cell-to-cell communication controls multiple physiologies. *Front. Microbiol.* 4: 1-12.

Cummings, R.T., Salowe, S.P., Cunningham, B.R., Wiltsie, J., Park, Y.W., Sonatore, L.M., Wisniewski, D., Douglas, C.M., Hermes, J.D., Scolnick, E.M. 2002. A peptide-based fluorescence resonance energy transfer assay for *Bacillus anthracis* lethal factor protease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:6603-6606.

Czajkowski, R., Krzyzanowska, D., Karczewska, J., Atkinson, S., Przysowa, J., Lojkowska, E., Williams, P., Jafra, S. 2011. Inactivation of AHLs by *Ochrobactrum* sp. A44 depends on the activity of a novel class of AHL acylase. *Environ. Microbiol. Rep.* 3: 59-68.

D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., Dessaux, Y. 2005. Diversity of N-acylhomoserine lactone-producing and degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 7: 1796-1808.

da Cunha, M.G., Franchin, M., Câmara de Carballo Galvao, L., Bueno-Silva, B., Ikegaki, M., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L. 2013. Apolar bioactive fraction of *Meliponascutellaris geopropolis* on *Streptococcus mutans* biofilm. *Evid Based Complement Alternat Med.* 256287.

Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Jansen, J., Braeken, K., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., Lambrichts, I., De Vos, D.E., Vanderleyden, J. 2006. Quorum sensing molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *P. Natl. Acad. Usa.* 103: 14965-14970.

Das, T., Sehar, S., Manfield, M. 2013. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ. Microbiol. Rep.*

Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat rev Drug Discov.* 2003; 2: 114-122.

Dawson, M.H., Sia, R.H.P. 1931. In vitro transformation of pneumococcal types. I. A technique for inducing transformation of pneumococcal types in vitro. *J. Exp. Med.* 54: 681-699.

Decho, A., Visscher, P.T., Ferry, J., Kawaguchi, T., He, L., Prżqkop, K.M., Norman, R.S., Reid, R.P. 2009. Autoinducers extracted from microbial mats reveals a surprising diversity of *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) and abundance changes that may relate to diel pH. *Environ. Microbiol.* 11: 409–420.

Decho, A.W., Norman, R.S., Visscher, P.T. 2010. Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends Microbiol.* 18: 73-80.

Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. 2010. Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLOS Pathog.* 6: e1000989.

Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacteria infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.* 25: 472-479.

Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T. K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P. 2006. Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii* and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6419-6423.

Defoirdt, T., Sorgeloos, P. 2012. Monitoring of *Vibrio harveyi* quorum sensing activity in real time during infection of brine shrimp larvae. *IMSE J.* 6, 2314-2319.

DeKeersmaecker, S.C., Vanderleyden, J. 2003. Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiol.* 149, 1953-1956.

Del Vecchio, P., Elias, M., Merone, L., Graziano, G., Dupuy, J., Mandrich, L., Carullo, P., Fournier, B., Rochu, D., Rossi, M., Masson, P., Chabriere, E., Manco, G. 2009. Structural determinants of the high thermal stability of SsoPox from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles.* 13: 461-470.

Delalande, L., Faure, F., Raffoux, A., Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Elasri, M., Carlier, A., Berruyer, R., Petit, A., Williams, P., Dessaux, Y. 2005. *N*-hexanoyl-l-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 13-20.

Deng, D.M., ten Cate, J.M., Crielaard, W. 2007. The adaptative response of *Streptococcus mutans* towards oral care products: involvement of the ClpP serine protease. *Eur. J. Oral. Sci.* 115: 363-370.

Diggle, S.P., Griffin, A.S., Campbell, G.S., West, S.A. 2007. Cooperation and conflict in quorum sensing bacterial populations. *Nature.* 450: 411–414.

Doberva, M., Sanchez-Ferandin, S., Toulza, E., Lebaron, P., Lami, R. 2015. Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling Metagenomic Database. *Aquat. Microb. Ecol.* 74: 107–119.

Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., Paul, V.J. 2011. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling.* 27: 893-905.

Dobretsov, S., Teplitski, M., Paul, V. 2009. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. 25: 413-427.

Dong, W., Zhu, J., Guo, X., Kong, D., Zhang, Q., Zhou, Y., Liu, X., Zhao, S., Ruan, Z. 2018. Characterization of AiiK, an AHL lactonase, from *Kurthia huaki* LAM0618T and

its application in quorum quenching on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Sci. Rep. 8: 6013.

Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L. Zhang, L. H. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1754-1759.

Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., Zhang, H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature. 411: 813-817.

Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., Zhang, L.H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 35626-3531.

Dong, Y.H., Zhang, L.H. 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. J. Microbiol. 43: 101-109.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 15:167-193.

Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B. N. 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. J. Lipid Res. 46: 1239-1247.

Dubern, J.F., Diggle, S.P. 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. Mol. Biosyst. 4: 882-888.

Duran-Pinedo, A.E., Frias-Lopez, J. 2015. Beyond microbial community composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. Microbes. Infect. 17: 505-516.

Eberl, L., Tümmler, B. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. Int. J. Med. Microbiol. 294: 123-131.

Ebersole, J.L., Dawson, D 3rd, Emecen-Huja, P., Nagarajan, R., Howard, K., Grady, M.E., Thompson, K. Peyyala, R., Al-Attar, A., Lethbridge, K., Kirakodu, S., Gonzalez, O.A. 2017. The periodontal war: microbes and immunity. Periodontol 2000. 75: 52-115.

Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than in BLAST. Bioinformatics. 26: 2460.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics. 27: 194-200.

Espacenet. Disponible en: <http://www.worldwide.espacenet.com> (Accedido el 5 de septiembre, 2018).

Exterkate, R.A., Crielaard, W., Ten Cate, J.M. 2010. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. Caries Res. 44:372-379.

Federle, M. J., Bassler, B. L. 2003. Interspecies communication in bacteria. J. Clin. Invest. 112: 1291-1299.

Ferrer, M.D., Rodríguez, J.C., Álvarez, L., Artacho, A., Royo, G., Mira, A. 2016. Effect of antibiotics on biofilm inhibition and induction measured by Real-Time Cell Analysis. J Appl Microbiol. 122:640-650.

Feugeas, J.P., Tourret, J., Launay, A., Bouvet, O., Hoede, C., Denamur, E., Tenaillon, O. 2016. Links between transcription, environmental adaptation and gene variability in *Escherichia coli*: Correlations between gene expression and gene variability reflect growth efficiencies. *Mol. Biol. Evol.* 33:2515–2529.

Fong, K.P., Chung, W.O., Lamont, R.J., Demuth, D.R. 2001. Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infect Immun.* 69:7625-7634.

Freeman, J.A., Bassler, B.L. 1999. A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol* 31, 665-677.

Frias, J., Olle, E., Alsina, M. 2001. Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. *Infect Immun.* 69:3431-3434.

Frias-Lopez, J., Duran-Pinero, A. 2012. Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J. Bacteriol.* 194: 2082-2095.

Fuqua, C., Greenberg, E. P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Rev.* 3: 685-695.

Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269-275.

Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., Spring, D. R. 2011. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. *Chem. Rev.* 111: 28–67.

Ganesh, S., Parris, D.J., DeLong, E.F., Stewart, F.J. 2014. Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *ISME J.* 8:187–211,

Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J.B., Bauer, W.D. 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 827–834.

García-Contreras, R., Maeda, T., Wood, T.K. 2016. Can resistance against quorum-sensing interference be selected? *ISME J.* 10:4-10.

Garge, S.S., Nerurkar, A.S., 2016. Attenuation of quorum sensing regulated virulence of *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum* through an AHL lactonase produced by *Lysinibacillus* sp. Gs50. *PLoS One.* 11: e0167344.

Ghani, N.A., Sulaiman, J., Ismail, Z., Chan, X.Y., Yin, W.F., Chan, K.G. 2014. *Rhodotorula mucilaginosa*, a quorum quenching yeast exhibiting lactonase activity isolated from tropical shoreline. *Sensors (Basel).* 14: 6463-6473.

Gilson, L.; Kuo, A., Dunlap. 1995. AinS and a new family of Autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* 177: 6946-6951.

Girard, L., Lantoine, F., Lami, R., Vouvé, F., Suzuki, M.T., Baudart, J. 2019. Genetic diversity and phenotypic plasticity of AHL-mediated Quorum sensing in environmental strains of *Vibrio mediterranei*. *ISME J.* 13: 159-169.

Givskov, M., de Nys, R., Manfield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S. 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. *J. Bacteriol.* 178, 6618-6622.

- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J.F. 2012. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 409:267–300,
- Goh, S.Y., Khan, S.A., Tee, K.K., Kasim, N.H.A., Yin, W.F., Chan, K.G. 2016. Quorum sensing activity of *Citrobacter amalonaticus* L8A, a bacterium isolated from dental plaque. *Sci Rep.* 6:20702.
- Goh, S.Y., Tan, W.S., Khan, S.A., Chew, H.P., Kasim, N.H.A., Yin, W.F., Chan, K.G. 2014. Unusual multiple production of N-acylhomoserine lactones a by *Burkholderia* sp. strain C10B isolated from dentine caries. *Sensors.* 14:8940-8949.
- Golberg, K., Pavlov, V., Marks, R.S., Kushmaro, A. 2013. Coral-associated bacteria, quorum sensing disrupters, and the regulation of biofouling. *Biofouling.* 29, 669-682.
- Gong, Y., Tian, X.L., Shuterland, T., Sisson, G., Mai, J., Ling, J., Li, Y.H., 2009. Global transcriptional analysis of acid-inducible genes in *Streptococcus mutans*: multiple two-component systems involved in acid adaptation. *Microbiology.* 155: 3322-3332.
- Gram, L., Grossart, H.P., Schlingloff, A., Kiorboe, T. 2002. Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4111-4116.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D. 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *40: 86-116.*
- Greenberg, E.P., Hastings, J.W., Ulitzur, S. 1979. Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria. *Arch Microbiol.* 120: 87-91.
- Gross, E.L., Leys, E.J., Gasparovich, S.R., Firestone, N.D., Schwartzbaum, J.A., Janies, D.A., Asnami, K., Griffe, A.L. 2010. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *Journal of clinical microbiology.* 48: 4121-4128.
- Guendouze, A., Plener, L., Bzdrenga, J., Jacquet, P., Rémy, B., Elias, M., Lavigne, J.P., Daudé, D., Chabrière, E. 2017. Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum sensing inhibitors. *Front Microbiol.* 8:227.
- Guo, L., He, X., Shi, W. 2014. Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Front Microbiol.* 5:328.
- Gupta, P., Chhibber, S., Harjai, K. 2015. Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systematic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model. *Burns.* 41: 153-162.
- Gutiérrez, D., Hidalgo-Cantabrana, C., Rodríguez, A., García, P., Ruas-Madiedo, P. 2016. Monitoring in Real Time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology. *PloS One.* 11: e0163966.
- Hajishengallis, G., Darveau, R.P., Curtis, M.A. 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 10:717-725.
- Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M.A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M.A., McIntosh, M.L., Alsam, A., Kirkwood, K.L., Lambris, J.D., Darveau, R.P., Curtis, M.A. 2011. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host & Microbe.* 17: 497-506.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 13: 7-10.

Hamada S, Slade HD. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 44: 331-384.

Hojo, K., Nagaokas, S., Ohshima, T., Maeda, N. 2009. Bacterial interactions in dental biofilm development. J. Dent. Res. 88: 982-990.

Haro-Moreno, J.M, López-Pérez, M., de la Torre, J.R., Pizaco, A., Camacho, A., Rodriguez-Valera, F. 2018. Fine metagenomic profile of the Mediterranean stratified and mixed water columns revealed by assembly and recruitment. Microbiome. 6: 128.

Hasan, S., Danishuddin, M., Khan, A.U. 2015. Inhibitory effect of *Zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: in vitro and in vivo studies. BMC Microbiol. 15:1-14.

Hawwa, R., Aikens, J., Turner, R.J., Santarsiero, B.D., Mesecar, A.D. 2009. Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from *Geobacillus stearothermophilus*. Arch Biochem Biophys. 488:109-120.

Hawwa, R., Larsen, S.D., Ratia, K., Mesecar, A.D. 2009 Structure-based and random mutagenesis approaches increase the organophosphate-degrading activity of a phosphotriesterase homologue from *Deinococcus radiodurans*. J Mol Biol. 393:36-57.

He, X.S., Shi, W.Y. 2009. Oral Microbiology: past, present and future. Int. J. Oral Sci. 1: 47-58.

He, Z., Wang, Q., Hu, Y., Liang, J., Jiang, Y., Ma, R., Tang, Z., 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. Int. J. Antimicrob Ag. 40, 30-35.

Henderson, B., Nair, S.P., Ward, J.M., Wilson, M. 2003. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Annu. Rev. Microbiol. 57: 29-55.

Hendrickson, E.L., Wang, T., Dickinson, B.C., Whitmore, S.E., Wright, C.J., Lamont, R.J., Hackett, M. 2012. Proteomics of *Streptococcus gordonii* within a model developing oral microbial community. BCM Microbiol. 12: 211.

Henke, J.M., Bassler, B.L. 2004. Three parallel Quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. J. Bacteriol. 186, 6902-6914.

Hentzer, M., Givskov, M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. J. Clin. Invest. 112: 1300-1307.

Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F. 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. ISME J. 5: 1571-1579.

Hiblot, J., Gotthard, G., Chabriere, E., Elicas, M. 2012. Structural and enzymatic characterization of the lactonase SisLac from *Sulfolobus islandicus*. PLoS One. 7. E47028.

Hiblot, J., Gotthard, G., Champion, C., Chabriere, E., Elias, M. 2013. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lactonase VmmoLac from *Vulcanisaeta moutnovskia*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 69: 1235-1238.

Hiranmayi, K.V., Sirisha, K., Ramoji Rao, M.V., Sudhakar, P. 2017. Novel pathogens in periodontal microbiology. J. Pharm. Bioallied Sci. 9: 155-163.

- Hmelo, L. R. 2017. Quorum sensing in marine microbial environments. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 9: 257-281.
- Hmelo, L.R., Tracy, J.M., Van Mooy, B.A.S. 2011. Possible influence of bacterial quorum sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments. *Environ. Microbiol. Rep.* 3: 682-688.
- Hmelo, L.R., Van Mooy, B.A.S. 2009. Kinetic constraint on acylated homoserine lactone-based quorum sensing in marine environments. *Aquat. Microb. Ecol.* 54:127-133.
- Holm, A., Vikström, E. 2014. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front. Plant. Sci.* 5: 309.
- Horikawa, M., Tateda, K., Tuzuki, E., Ishii, Y., Ueda, C., Takabatake, T., Miyairi, S., Yamaguchi, K., Ishiguro, M. 2006. Synthesis of *Pseudomonas* quorum-sensing autoinducer analogs and structural entities required for induction of apoptosis in macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 2130-2133.
- Hraiech, S., Hiblot, J., Lafleur, J., Lepidi, H., Papazian, L., Rolain, J.M., Raoult, D., Elias, M., Silby, M.W., Bzdrenga, J., Bregeon, F., Chbriere, E. 2014. Inhaled lactonase reduced *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and mortality in rat pneumonia. *PLOS One.* 9: e107125.
- Huang, Z., Meric, G., Liu, Z., Ma, R., Tang, Z., Lejeune, P. 2009. luxS-based quorum-sensing signaling affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 17:12-19.
- Huang, J. J., Han, J. I., Zhang, L. H., Leadbetter, J. R. 2003. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5941-5949.
- Huang, J. J., Petersen, A., Whiteley, M., Leadbetter, J. R. 2006. Identification of QuiP, the product of Gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1190-1197.
- Huang, L., Xu, Q., Liu, C., Fan, M.W., Li, Y.H. 2013. Anti-caries DNA vaccine-induced secretory immunoglobulin A antibodies inhibit formation of *Streptococcus mutans* biofilm *in vitro*. *Acta Pharmacol. Sin.* 34: 239-246.
- Huang, W., Lin, Y., Yi, S., Liu P, Shen, J., Shao, Z., Liu, Z. 2012. QsdH, a Novel AHL Lactonase in the RND-Type Inner Membrane of Marine *Pseudoalteromonas byunsanensis* Strain 1A01261. *PLoS ONE* 7: e46587.
- Huang, X., Palmer, S.R., Ahn, S.J., Richards, V.P., Williams, M.L., Nascimento, M-M., Burne, R.A. 2016. A highly arginolytic streptococcus species that potently antagonizes *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 2187-2201.
- Huang, Y., Gilna, P., Li, W. 2009. Identification of ribosomal RNA genes in metagenomic fragments. *Bioinformatics.* 25:1338-1340.
- Huang, Y.L., Ki, J.S., Case, R.J., Qian, P.Y. 2008. Diversity and acyl-homoserine lactone production among subtidal biofilm-forming bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 52: 185-193.
- Huang, Z., Meric, G., Liu, Z., Ma, R., Tang, Z., Lejeune, P. 2009. luxS-based quorum-sensing signaling affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 17: 12-19.

Hughes, D.T., Sperandio, V. 2008. Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and their hosts. *Nat. rev. Microbiol.* 6: 111-120.

Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 486:207-214

Inaba, T., Oura, H., Morinaga, K., Toyofuku, M., Nomura, N. 2015. The *Pseudomonas* Quinolone Signal inhibits biofilm development of *Streptococcus mutans*. *Microbes Environ.* 30:189-191.

Islam, B., Khan, S.N., Haque, I., Alam, M., Mushfip, M., Asad, U. 2008. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. *J Antimicrob Chemother.* 62:751-757.

Islam, B., Khan, S.N., Naeem, A., Sharma, V., Khan, A.U. 2009. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1682-1689.

Ivanova, K., Fernandes, M.M., Francesko, A., Mendoza, E., Guezquez, J., Burnet, M, Tzanov T. 2015. Quorum-Quenching and matrix-degrading enzymes in multilayer coatings synergistically prevent bacterial biofilm formation on urinary catheters. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7:27066–27077.

Jang, Y.J., Choi, Y.J., Lee, S.H., Jun, H.K., Choi, B.K. 2013. Autoinducer 2 of *Fusobacterium nucleatum* as a target molecule to inhibit biofilm formation of periodontopathogens. *Arch. Oral Biol.* 58:17-27.

Janus, M.M., Crielaard, W., Zaura, E., Keijsers, B.J., Brandt, B.W, Krom, B.P. 2016. A novel compound to maintain a healthy oral plaque ecology in vitro. *J. Oral Microbiol.* 8: 32513.

Janus, M.M., Keijsers, B.J., Bikker, F.J., Exterkate, R.A., Crielaard, W., Krom, B.P. 2015. In vitro phenotypic differentiation towards commensal and pathogenic oral biofilms. *Biofouling.* 31:503-510.

Jatt, A.N., Tang, K., Liu, J., Zhang, Z., Zhang, X.H. 2015. Quorum sensing in marine snow and its possible influence on production of extracellular hydrolytic enzymes in marine snow bacterium *Pantoea anatatis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91: 1-13.

Jenkinson, H.F., Lamont, R.J., 1997. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 8: 175-200.

Jeong, S.I., Kim, B.S., Keum, K.S., Lee, K.H., Kang, S.Y., Park, B.I., Lee, Y.R., You, Y.O. 2013. Kaurenoic acid from *Aralis continentalis* inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 160592.

Ji, G., Beavis, R., Novick, R.P. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science.* 276: 2027-2030.

Jo, S.J., Kwon, H., Jeong, S.Y., Lee, S.H., Oh, H.S., Yi, T., Lee, C.H., Kim, T.G. 2016. Effects of quorum quenching on the microbial community of biofilm in an anoxic/oxic MBR for wastewater treatment. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1593-1604.

Joint, I., Tait, K., Callow, M.E., Milton D., Williams, P., Cámara, M. 2002. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science.* 298:1207.

Junka, A.F., Janczura, A., Smutnicka, D., Maczynska, B., Secewicz, A., Nowick, J., Bartoszewicz, M., Gosciniak, G. 2012. Use of the Real Time xCELLigence System for purposes of medical microbiology. *Pol. J. Microbiol.* 61:191-197.

- Kalia, V.C. 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. 31: 224-245.
- Kalia, V.C., Wood, T.K., Kumar, P. 2014. Evolution of resistance to quorum quenching sensing inhibitors. *Microb. Ecol.* 68: 13-23.
- Kallnik, V., Bunescu, A., Sayer, C., Bräsen, C., Wohlgemuth, R., Littlechild, J., Siebers, B., 2014. Characterization of a phosphotriesterase-like lactonase from the hypermoacidophilic crenarchaeon *Vulcanisaeta moutnovskia*. *J. Biotechnol.* 190: 11-17.
- Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.H., Roggers, C.J., Meijler, M.M., Moss, J.A., Clapham, B., Brogan, A.P., Dickerson, T.J., Janda, K.D. 2005. Revisiting quorum sensing: discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *P. Natl. Acad. Sci USA.* 102: 3330009-314.
- Kim, B.S., Park, S.J., Kim, M.K., Kim, Y.H., Lee, S.B., Lee, K.H., Choi, N.Y., Lee, Y.R., Lee, Y.E., You, Y.O. 2015. Inhibitory effects of *Chrysanthemum boreale* essential oil on biofilm formation and virulence factor expression of *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 616309.
- Kim, J.H., Choi, D.C., Yeon, K.M., Kim, S.R., Lee, C.H. 2011. Enzyme-immobilized nanofiltration membrane to mitigate biofouling based on quorum quenching. *Environ. Sci. Technol.* 45: 1601-1607.
- Kjelleberg, S., Steinberg, P., Givskov, M., Gram, L., Manefield, M., de Nys, R. 1997. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquat. Microb. Ecol.* 13:85-93.
- Kjelleberg, S., McDougald, D., Rasmussen, T.B., Givskov, M. 2008. Quorum-sensing inhibition. In *Chemical communication among bacteria*; Editor Winans, S.C.; Basler, B.L. ASM Press, USA, pp. 393-416.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P., de Vos, W.M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895-904.
- Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R.H., Quax, W.J. 2014. *Deinococcus radiodurans* can interfere with quorum sensing by producing an AHL-acylase and an AHL-lactonase. *FEMS Microbiol. Lett.* 356: 62-70.
- Kolenbrader, P.E., Palmer, R.J., Periasamy, S., Jakubovics, N.S. 2010. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 471-480.
- Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Rickard, A.H., Jakubovics, N.S., Chalmers, N.I., Diaz, P.I. 2006. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 42: 47-49.
- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Eglund, P.S., Foster, J.S., Palmer, R.J. Jr. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 486-505.
- Komiya-Ito, A., Ito, T., Yamanaka, A., Okuda, K., Yamada, S., Kato, T. 2006. N-tetradecanoyl homoserine lactone, signaling compound for quorum sensing, inhibits *Porphyromonas gingivalis* growth. *Research J. Microbiol.* 1:353-359.
- Koo, H., Jeon, J.G. 2009. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. *Adv. Dent Res.* 21:63-68.

Koopman, J.E., Buij, M.J., Brandt, B.W., Keijser, B.J., Crielaard, W., Zaura, E. 2016. Nitrate and the Origin of Saliva Influence Composition and Short Chain Fatty Acid Production of Oral Microcosms. *Microb. Ecol.* 72:479-492.

Kumari, A., Pasini, P., Daunert, S. 2008. Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 1619-1927.

Kouidhi, B., Quarashi, Y.M.A.A., Chaieb, K. 2015. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microbiol. Pathog.* 80:39-49.

Krysciak, D., Schmeisser, C., Preuß, S., Riethausen, J., Quitschau, M., Grond, S., Streit, W.R. 2011. Involvement of multiple loci in quorum quenching of autoinducer I molecules in the nitrogen-fixing symbiont *Rhizobium (Sinorhizobium)* sp. strain NGR234. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 5089-5099.

Kubanek, J., Snell, T. W. 2008. Quorum sensing in rotifers. En *Chemical communication among bacteria*. Winans, S. C., Bassler, B. L. Washington, DC: ASM Press. 453-461.

Kumar, P.S., Griffen, A.L., Moeschberger, M.L., Leys, E.J. 2005. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3944-3955.

Kumari, A., Pasini, P., Deo, S.K., Flomenhoft, D., Shashidhar, H., Daunert, S. 2006. Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. *Anal. Chem.* 78: 7603-7609.

Kusada, H., Tamaki, H., Kamagata, Y., Hanada, S., Kimura, N. 2017. A novel quorum-quenching N-acylhomoserine lactone acylase from *Acidovorax* sp. strain MR-S7 mediates antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 83: e00080-17.

Lade, H., Paul, D., Kweon, J.H. 2014. Quorum Quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *Int. J. Biol. Sci.* 10: 550-565.

Lamont, R.J., Jenkinson, H.F., 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 15: 341-349.

LaPlante, K.L., Sarkisian, S.A., Woodmansee, S., Rowley, D.C., Seerem, N.P. 2012. Effects of cranberry extracts on growth and biofilm production of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* species. *Phytother. Res.* 26: 1371-1374.

LaSarre, B., Federle, M.J. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 77: b73-111.

Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S.A., Hardam, A., Downie, J.A., O'Gara, F., Williams, P. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the rhizobium small bacteriocin, N-(3-Hydroxy-7-Cis-Tetradecenoyl) Homoserine Lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiol.* 146: 2469-2480.

Lazazzera, B. A., Solomon, J. M., Grossman, A. D. 1997. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell.* 89: 917-25.

Leadbetter, J.R., Greenberg, E.P. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 182: 6921-6926.

Lahti, L., Sudarshan, S. et al. 2017. Bioconductor. Tools for microbiome analysis in R. Microbiome package version 1.4.0. URL: <http://microbiome.github.io/microbiome>

- Lee, H.J., Kim, S.C., Kim, J., Do, A., Han, S.Y., Lee, B.D., Lee, H.H., Lee, M.C., Lee, S.H., Oh, T., Park, S., Hong, S.H. 2015. Synergistic inhibition of Streptococcal biofilm by ribose and xylitol. *Arch. Oral Biol.* 60, 304-312.
- Lee, K.H., Kim, B.S., Keum, K.S., Yu, H.H., Kim, Y.H., Chang, B.S., Ra, J.Y., Moon, H.D., Seo, B.R., Choi, N.Y., You, Y.O. 2011. Essential oil from *Curcuma longa* inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. *J Food Sci.* 76:226-230.
- Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T., Lee, J. K. 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3919-3924.
- Leguina, A.C.V., Nieto, C., Pajot, H.M., Bertini, E.V., Mac Cormack, W., Castellanos de Figueiroa, L.I., Nieto-Peñalver, C.G. 2018. Inactivation of bacterial quorum sensing signals N-acyl homoserine lactones is widespread in yeast. *Fungal Biol.* 122: 52-62.
- Li, Y., Burne, R.A. 2001. Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiology.* 147: 2841-2848.
- Li, Y.H., Hanna, M.N., Svensäter, G., Ellen, R.P., Cvitkovitch, D.G. 2001. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: Implications for survival in biofilms. *J Bacteriol.* 183:6875-6884.
- Li, Y.H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C.Y., Lee, L.J.H., Ellen, R.P., Cvitkovitch D. 2002. A quorum-sensing signalling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 184:2699-2708.
- Liberio, S.A., Pereira, A.L., Dutra, R.P., Reis, A.S., Araújo, M.J., Mattar, N.S., Silva, L.A., Ribeiro, M.N., Nascimento, F.R., Guerra, R.N., Monteiro-Neto, V. 2011. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Meliponafasciculata* Smith. *BMC Complement. Altern. Med.* 11:108.
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., Zhang, L. H. 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* 47: 849-860.
- Linthorne, J.S., Chang, B.J., Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L., Sutton, D.C. 2014. A direct pre-screen for marine bacteria producing compounds inhibiting quorum sensing reveals diverse planktonic bacteria that are bioactive. *Mar. Biotechnol.* 17: 33-42.
- Liu, C., Guo, S., Turak, A., Zhang, J., Zhang, L. 2017. AidE encodes an N-acyl homoserine lactonase in *Acinetobacter*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 33: 1625-1639.
- Liu, C.F., Liu, D., Momb, J., Thomas, P.W., Lajoie, A., Petsko, G.A., Fast, W., Ringe, D. 2013. A phenylalanine clamp controls substrate specificity in the quorum-queching metallo- γ -lactonase from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry.* 52:1603-1610.
- Loesche, W.J. 1976. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci. Rev.* 9: 65-107.
- Lönn-Stensrud, J., Petersen, F.C., Benneche, T., Aamdal Scheie, A. 2007. Synthetic bromated furanone inhibits autoinducer-2-mediated communication and biofilm formation in oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* 22:340-346.
- López, M., Mayer, C., Fernández-García, L., Blasco, L., Muras, A., Ruiz, F.M., Bou, G., Otero, A., Tomás, M., GEIH-GEMARA (SEIMC). 2017. Quorum sensing network in clinical strains of *A. baumannii*: AidA is a new quorum quenching enzyme. *PLoS One.* 12: e0174454.

López-López, A., Camelo-Castillo, A., Ferrer, M.D., Simón-Soro, A., Mira, A. 2017. Health-Associated niche inhabitants as oral probiotics: the case of *Streptococcus dentisani*. 8: 379.

López-Pérez, M.; Haro-Moreno, J.M.; Gonzalez-Serrano, R.; Parras-Moltó, M.; Rodriguez-Valera, F. 2017. Genome diversity of marine phages recovered from Mediterranean metagenomes: Size matters. PLoS Genet. 13: e1007018.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 193: 265-275.

Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 489: 220-230.

Maeda, T., García-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., García, L.R., Tomás, M., Wood, T.K. 2012. Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. ISME J. 6: 493-501.

Magoc, T., Salzberg, S.L. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics. 27: 2957-2963.

Mallo, N. 2009. Detección de señales de quorum sensing en bacterias orales. Trabajo Fin de Máster. Universidade de Santiago de Compostela.

Manefield, M., de Nys R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S. 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. Microbiol. 145: 283-291.

Manefield, R., Rasmussen, T.B., Henzter, M., Andersen, J.B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M. 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. Microbiology. 148: 1119-1127.

Marsh PD. 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res. 8:263-271.

Marsh, P.D. 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology. 149: 279-294.

Marsh, P.D. 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries. Res. 38: 204-211.

Marsh, P.D. 2006. Dental plaque as biofilm and microbial community-Implications for health and disease.

Marsh, P.D., Do., T., Beighton, D., Devine, D. 2016. Influence of saliva on the oral microbiota. Periodontology 2000. 70: 80-92.

Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet J. 17:10-12.

Maske, T.T., Van de Sande, F.H., Arthur, R.A., Huysmans, M.C.D.N.J.M., Cenci, M.S. 2017. *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systemic review. Biofouling. 33: 661-675.

Mayer, C., Muras, A., Romero, M., Rumbo-Feal, S., López Días, M., Tomás, M., Otero, A. 2018. Multiple quorum quenching enzymes are active in the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC17978. Front. Cell Infect. Microbiol. 8:310.

Mayer, C., Romero, M., Muras, A., Otero, A. 2015. Aii20J, a wide spectrum thermo-stable *N*-acylhomoserine lactonase from the marine bacterium *Tenacibaculum* sp. 20J can

quench AHL-mediated acid resistance in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 9523-9539.

McBain, A.J., Sissons, C., Ledder, R.G., Sreenivasan, P.K., De Vizio, W., Gilbert, P. 2005. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. J Appl Microbiol. 98:624-634.

McBain, A.J., 2009. In vitro biofilm models: an overview. Adv. Appl. Microbiol. 69: 99-132

McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Cámara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Williams, P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. Microbiology. 143: 3703–3711.

McLean, R.J., Pierson, L.S. 3rd, Fuqua, C. 2004. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. J. Microbiol. Methods. 58: 351-360.

McMurdie, P.J., Holmes, S. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE. 8:e61217.

McNab, R., Ford, S.K., El-Sabaeny, A., Barbieri, B., Cook, G.S., Lamont, R.J. 2003. Lux-S based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 185: 274-284.

Mei, G.Y., Yan, X.X., Turak, A., Luo, Z.Q., Zhang, L.Q. 2010. AidH, an alpha/beta hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel *N*-acylhomoserine lactonase. Appl. Environ. Microbiol. 76: 4933–4942.

Mei, M.L., Chu, C.H., Lo, E.C.M., Samaranayake, I.P. 2013. Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. Med. Oral. Patol. Oral Cir. Bucal. 18: e557-e563.

Mei, M.L., Li, Q.L., Chy, C.H., Lo, E.C.M., Samaranayake, L.P. 2013. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 12: 4.

Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M., Manco, G. 2005. A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Cloning, overexpression and properties. Extremophiles. 9: 297–305.

Merritt, J, Qi, F., Goodman S.D., Anderson, M.H., Shi, W. 2003. Mutation of *luxS* Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 71: 1972–1979.

Miller, M. B., Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55: 165-199.

Milton D. L., Chalker V. J., Kirke D., Hardman A., Cámara M., Williams P. 2001. The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of *N*-(3-hydroxyhexanoyl) homoserine lactone and *N*-hexanoylhomoserine lactone. J. Bacteriol. 183: 3537-3547.

Mira, A., 2018. Oral Microbiome Studies: Potential Diagnostic and Therapeutic implications. Adv. Dent. Res. 29: 71-77.

Mira, A., Buetas, E., Rosier, B., Mazurel, D., Villanueva-Castellote, Llena, C., Ferrer, M.D. 2019. Development of an in vitro system to study oral biofilms in real time through

impedance technology: validation and potential applications. *J. Oral Microbiol.* 11: 1609838.

Mira, A., Simón-Soro, A., Curtis, M.A. 2017. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J. Clin. Periodontol.* 44 Supple 18: S23-S38.

Miraula, Schenk, G., Mitic, N. 2016. Promiscuous metallo- β -lactamases: MIM-1 and MIM-2 may play an essential role in quorum sensing networks. *J Inorg Biochem.* 162: 366-375.

Mohamed, N.M., Cicirelli, E.M., Kan, J., Chen, F., Fuqua, C., Hill, R.T. 2008. Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. *Environ. Microbiol.* 10: 75-86.

Momb, J., Wang, C., Liu, D., Thomas, P.W., Petsko, G.A., Guo, H., Ringe, D., Fast, W. 2008. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. Substrate modeling and active site mutations. *Biochemistry.* 47: 7715-7725.

Moreau-Marquis, S., Stanton, B.A., O'Toole, G.A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2008; 21: 595-599.

Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., Ikeda, T. 2008a. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol. Lett.* 279: 124-130.

Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N., Ikeda, T. 2008b. Identification and characterization of N-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:1887-1893.

Morohoshi, T., Sato, N., Iizumi, T., Tanaka, A., Ikeda, T. 2017. Identification and characterization of a novel N-acyl-homoserine lactonase gene in *Sphingomonas ursincola* isolated from industrial cooling water systems. *J. Biosci. Bioeng.* 123: 569-575.

Morohoshi, T., Tominaga, Y., Someya, N., Ikeda, T. 2012. Complete genome sequence and characterization of the N-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. *J. Biosci. Bioeng.* 113: 20–25.

Morohoshi, T., Tominaga, Y., Someya, N., Ikeda, T. 2015. Characterization of a novel thermostable N-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium *Thermaerobacter marianensis*. *J. Biosci Bioeng.* 120: 1-5.

Morohoshi, T., Someya, N., Ikeda, T. 2009. Novel N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 2124-2127.

Mukherji, R., Varshney, N.K., Panigrahi, P., Suresh, C.G., Prabhune, A. 2014. A new role for penicillin acylases: degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Technol.* 56: 1-7.

Muras, A., López-Pérez, M., Mayer, C., Parga, A., Amaro-Blanco, J., Otero, A. 2018. High prevalence of quorum-sensing and quorum-quenching among cultivable bacteria and metagenomic sequences in the Mediterranean Sea. *Genes.* 9: 100.

Muras, A., Mayer, C., Otero, P., Exterkate, R.A.M., Brandt, B.W., Crielaard, W., Otero, A., Krom, B.P. Short chain N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules promote periodontal pathogens in in vitro oral biofilms. *Appl. Environ. Microbiol. Sometida.*

- Muras, A., Mayer, C., Romero, M., Camino, T., Ferrer, M.D., Mira, A., Otero, A. 2018. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by extracts of *Tenacibaculum* sp. 20J, a bacterium with wide-spectrum quorum quenching activity. *J. Oral Microbiol.* 10: e1429788.
- Murphy, T.A., Simm, A.M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Walsh, T.R. 2003. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 582-87.
- Murugan, K., Sekar, K., Sangeetha, S., Ranjitha, S., Sohaibani, S.A. 2013. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory activity of *Achryranthes aspera* on cariogenic *Streptococcus mutans*: An in vitro and in silico study. *Pharm. Biol.* 51: 728-736.
- Naginyte, M., Do, T., Meade, J., Devine, D.A., Marsh, P.D. 2019. Enrichment of periodontal pathogens from the biofilms of healthy adults. *Sci Reports.* 9: 5491.
- Nascimento, M.M. 2017. Oral microbiota transplant: a potential new therapy for oral diseases. *J. Calif. Dent. Assoc.* 45: 565-568.
- Natrah, F.M., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2011. Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Mar Biotechnol.* 13: 109-126.
- Nealson, K. H. 1977. Autoinduction of bacterial luciferase: occurrence, mechanism and significance. *Arch. Microbiol.* 112: 73-79.
- Nealson, K. H., Hastings, J. W. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43: 496-518.
- Nealson, K.H.; Platt, T.; Hastings, J.W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminiscent system. *J. Bacteriol.* 104: 313-322.
- Ng, F.S.W., Wright, D.M., Seah, S.Y.K. 2011. Characterization of a phosphotriesterase-like lactonase from *Sulfolobus solfataricus* and its immobilization for disruption of quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 1191-1186.
- Ng, W.L., Bassler, B.L. 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* 43: 197-222.
- Nhan, D.T., Cam, D.T.V, Wille, M., Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P. 2010. Quorum quenching bacteria protect *Macrobrachium rosenbergii* larvae from *Vibrio harveyi* infection. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1007-1016.
- Ni, N., Li, M., Wang, J., Wang, B. 2009. Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med. Res. Rev.* 29: 65-124.
- Nishihara, T., Koseki, T. 2004. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* 2000. 36: 14-26.
- Nithya, C., Aravindraja, C., Pandian, S.K. 2010. *Bacillus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* 161:293-304.
- Novak, E.A., Shao, H., Daep, C.A., Demuth, D.R. 2010. Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 78: 2919-2926.
- O'Donnell, L.E., Robertson, D., Nile, C.J., Cross, L.J., Riggio, M., Sherriff, A., Bradshaw, D., Lambert, M., Malcolm, J., Buijs, M.J., Zaura, E., Crielaard, W., Brandt,

B.W., Ramage, G. 2015. The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. PLoS One 10:e0137717.

Oh, H.S., Yeon, K.M., Yang, C.S., Kim, S.R., Lee, C.H., Park, S.Y., Han, J.Y., Lee, J.K. 2012. Control of membrane biofouling in MBR for wastewater treatment by quorum quenching bacteria encapsulated in microporous membrane. Environ. Sci. Technol. 46: 4877-4884.

Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H., Horinouchi, S. 1999. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. Mol. Microbiol. 34: 102-111.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H.H. 2017. Vegan: community ecology package. R package version 2.4.4.

Oliveira MRTR, Napimoga MH, Cogo K, Gonçalves RB, Macedo MLR, Freire MGM, Groppo FC. 2007. Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. J Oral Sci. 49:414-445.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2012. Nota informativa. N°318.

Otero Casal, A.M., Muñoz Crego, A., Bernárdez Hermida, M.I., Fábregas Casal, J. 2004. *Quorum Sensing*: El lenguaje de las bacterias. Acribia S.A.

Paju, S., Scannapieco, F.A. 2007. Oral biofilms, periodontitis and pulmonary infections. Oral Dis. 13: 208-512.

Pantarella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., Berlutti, F. 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. Ann. Ing. 25, 31-42.

Parga Martínez, A. 2019. Nuevos enzimas de quorum quenching para el control de bacterias patógenas en acuicultura. Trabajo fin de máster. Universidade de Santiago de Compostela.

Park, S. Y., Hwang, B. J., Shin, M. H., Kim, J. A., Kim, H. K., Lee, J. K. 2006. N-acylhomoserine lactonase-producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. FEMS Microbiol. Lett. 261: 102-108.

Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y., Lee, J. K. 2003. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. Microbiol. 149: 1541-1550.

Park, S.Y., Kang, H.O., Jang, H.S., Lee, J.K., Koo, B.T., Yum, D.Y. 2007. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2636-2641.

Parsek, M.R., Greenberg, E.P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signalling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 8789-8793.

Pasmore, M., Costerton, J.W. 2003. Biofilms, bacterial signaling and their ties to marine biology. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 407-413.

Patankar, A.V., González, J.E. 2009. Orphan LuxR regulators of quorum sensing. FEMS Microbiol. Rev. 33: 739-756.

Pechere, J. C. 2001. New perspectives on macrolide antibiotics. Int. J. Antimicrob. Agents 1: S93-S97.

- Pereira, C.S., Thompson, J.A., Xavier, K.B. 2013. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 37: 156-181.
- Perry, J.A., Cvitkovitch, D.G., Levesque, C.M. 2009. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 299:261-266.
- Persson, T., Hansen, H.T., Rasmussen, T.B, Skinderso, M.E., Givskov, M., Nielsen, J. 2005. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org. Biol.Chem.* 3: 253-262.
- Pesci, E. C., Iglewski, B. H. 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. En Cell-cell signaling in Bacteria. Dunny, G. M., Winans, S. C. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology. 147-155.
- Peters, A.C., Wimpenny, J.W. 1988. A constant-depth laboratory model film fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 263-270.
- Petersen, F.C., Pecharki, D., Scheie, A.A. 2004. Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide. *J Bacteriol.* 186: 6327-6331.
- Pinardi, N., Masetti, E. 2000. Variability of the large scale general circulation of the Mediterranean Sea from observations and modelling: A review. *Palaerogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 158: 153-173.
- Porzio, E., Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M., Manco, G. 2007. A new phosphotriesterase from *Sulfolobus acidocaldarius* and its comparison with the homologue from *Sulfolobus solfataricus*. *Biochimie.* 89: 625-636.
- Pritchard, A.B., Crean, StJohn, Olsen, I., Singhrao, S.K. 2017. Periodontitis, microbiomes and their role in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 9: 336.
- Qazi, S., Middleton, B., Muharram, S.H., Cockayne, A., Hill, P., O'Shea, P., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P. 2006. N-Acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and Quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 74: 910-919.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, Gerken, J., Schweb, T., Yarza, P., Peplies J., Glöckner, F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids. Res.* 41.
- R Core Team. 2012. Language and environment for statistical computing. ISBN 3-900051-07-0. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Rai, N., Rai, R., Venkatesh, K.V. 2015. Quorum sensing Biosensor. In Quorum Sensing vs Quorum Quenching: a battle with no end in sight; Editor Kalia, V.C; Springer, India, 2015; pp 173-183.
- Rajamani, S., Teplitski, M., Kumar, A., Krediet, C.J., Sayre, R.T., Bauer, W.D. 2011. N-acyl homoserine lactone lactonase, AiiA, inactivation of quorum-sensing agonists produced by *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) and characterization of aiiA-transgenic algae. *J. Phycol.* 47: 1219-1227.

Rajesh, P.S., Rai, V.R. 2014. Molecular identification of *aiiA* homologous gene from endophytic *Enterobacter* species and in silico analysis of putative tertiary structure of AHL-lactonase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443: 290-295.

Rajesh, P.S., Rai, V.R. 2014. Quorum quenching in cell-free lysate of endophytic bacteria isolated from *Pterocarpus santalinus* Linn, and its effect on quorum sensing regulated biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Res.* 169: 561-569.

Rajput, A., Kaur, K., Kumar, M. 2016. SigMol: repertoire of quorum sensing signaling molecules in prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 44: D634-D639.

Ransome, E., Munn, C.B., Halliday, N., Cámara, M., Tait, K. 2014. Diverse profiles of N-acyl-homoserine lactone molecules found in cnidarians. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87: 315-329.

Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W.J., Ekmann, S.K., Larsen, J.L., Johansen, C., Riedel, K., Eberl, L., Givskov, M., Gram, L. 2004. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *System. Appl. Microbiol.* 27: 350-359.

Rasmussen, L.H., Hojholt, K., Fargis, R., Christensen, J.J., Skovgaard, O., Justesen, U.S., Rosenvinge, F.S., Moser, C., Lukjancenko, O., Rasmussen, S., Nielsen, X.C. 2017. In silico assessment of virulence factors in strains of *Streptococcus oralis* and *Streptococcus mitis* isolated from patients with infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.* 66: 1316-1323.

Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M. 2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.* 187: 1799-1814.

Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., Daudé, D. 2018. Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective. *Front. Pharmacol.* 9: 203.

Rey Varela, D. 2015. Identificación y clonación de los enzimas responsables de la actividad quorum quenching en *Maribacter* sp. Cepa 139. Trabajo de Máster. Universidade de Santiago de Compostela.

Rice, S. A., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S. 1999. Bacterial signals and antagonists: the interaction between bacteria and higher organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 23-31.

Rickard, A.H., Palmer, R.J.J., Blehert, D.S., Campagna, S.R., Semmelhack, M.F., Eglund, P.G., Bassler, B.L., Kolenbrander, P.E. 2006. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol. Microbiol.* 60: 1446-1456.

Romero, M., Acuña, L., Otero, A. 2012. Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. *Recent Patents on Biotechnology.* 6: 2-12.

Romero, M., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M., Otero, A. 2010. Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) group. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 131-139.

Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Cámara, M., Otero, A. 2008. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 205-217.

- Romero, M., Martín-Cuadrado, A. M., Roca-Rivada, A., Cabello, A. M., Otero, A. 2011. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 205-217.
- Romero, M., Martín-Cuadrado, A.B., Otero, A. 2012. Determination of whether quorum quenching is a common activity in marine bacteria by analysis of cultivable bacteria and metagenomic sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6345-6348.
- Romero, M., Mayer, C., Muras, A., Otero, A. 2015. Silencing bacterial communication through enzymatic quorum sensing inhibition, in: Kalia, V.C. (Ed.), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: a battle with no end in sight*. Springer, India. pp 219-236.
- Romero, M., Muras, A., Mayer, C., Buján, N., Magariños, B., Otero, A. 2014. Quenching of AHLs production by the fish pathogen *Edwardsiella tarda* in vitro using cell extracts of the marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J. *Dis. Aquat. Organ.* 108: 217-225.
- Rosier, B.T., De Jager, M., Zaura, E., Krom, B.P. 2014. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4: 92.
- Rosier, B.T., Marsh, P.D., Mira, A. 2017. Resilience of the oral microbiota in health: mechanisms that prevent dysbiosis. *J. Den. Res.* 97: 371-380.
- Rudney, J.D., Chen, R., Lenton, P., Li, J., Li, Y., Jones, R.S., Reilly, C., Fork, A.S., Aparicio, C. 2012. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J. Appl. Microbiol.* 113: 1540-1553.
- Rumbo-Feal, S., Gómez, M.J., Gayoso, C., Álvarez-Fraga, L., Cabral, M.P., Aransay, A.M., Rodríguez-Ezpeleta, N., Fullaondo, A., Valle, J., Tomás, M., Bou, G., Poza, M. 2013. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. *PLoS One.* 8:e72968.
- Sampaio-Maia, B., Caldas, I.M., Pereira, M.L., Pérez-Mongiovi, D., Araujo, R. 2016. The oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases. *Adv. Appl. Microbiol.* 97: 171-210.
- Sánchez, M.C., Llama-Palacios, A., Blanc, V., León, R., Herrera, D., Sanz, M. 2011. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J. Periodontal Res.* 46: 252-260.
- Saurav, K., Bar-Shalom, R., Haber, M., Burgsdorf, I., Oliveiro, G., Constantino, V., Morgenstern, D., Steindler, L. 2016. In search of alternative antibiotics drugs: Quorum-quenching activity in sponges and their bacterial isolates. *Front. Microbiol.* 7; 1-18.
- Scannapieco, F.A. 1999. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J. Periodontol.* 70:793-802.
- Scannapieco, F.A., Bush, R.B., Paju, S. 2003. Associations between periodontal diseases and risk for atherosclerosis cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. *Ann. Periodontol.* 8: 38-53.
- Struss, A., Pasini, P., Ensor, C.M., Raut, N., Daunert, S. 2010. Paper strip whole cell biosensor: a portable test for the semiquantitative detection of bacterial quorum signaling molecules. *Anal. Chem.* 82: 4457-4463.
- Schauder, S., Bassler, B.L. 2001. The languages of bacteria. *Genes Dev.* 15: 1468-1480.

Schwab, M., Bergonzi, C., Sakkos, J., Staley, C., Zhang, Q., Sadowsky, M.J., Aksan, A., Elias, M. 2019. Signal disruption leads to changes in bacterial community population. *Front. Microbiol.* 10: 611.

Seemann, R., Bizhang, M., Klück, I., Loth, J., Roulet, J.F. 2005. A novel *in vitro* microbial-based model for studying caries formation-development and initial testing. *Caries Res.* 39: 185-190.

See-Too, W.S., Ee, R., Lim, Y.L., Convey, P., Pearce, D.A., Yin, W.F., Chan, K.G. 2017. AidP, a novel N-acyl homoserine lactonase gene from Antarctic *Planococcus* sp. *Sci Rep.* 7: 42968.

Senadheera, D., Cvitkovitch, D.G. 2008. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 631: 178-188.

Senadheera, D., Krastel, K., Mair, R., Persadmeht, A., Abranches, J., Burne, R.A., Cvitkovitch, D.G. 2009. Inactivation of VicK affects acid production and acid survival of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 191: 6415-6424.

Seo, M.J., Lee, B.S., Pyun, Y.R., Park, H. 2011. Isolation and characterization of N-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus caldxylosilyticus* YS-8. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75: 1789-1795.

Schmieder, R., Edwards, R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomics databases. *Bioinformatics.* 27: 863-864.

Shastri, R.P., Dolan, S.K., Abdelhamid, Y., Vittal, R.R., Welch, M. 2018. Purification and characterization of a quorum quenching AHL-lactonase from endophytic bacterium *Enterobacter* sp. CS66. *FEMS Microbiol. Lett.* 365.

Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Jr., Rinehart, K.L., Farrand, S.K. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 6036-6041.

Shepherd, R.W., Lindow, S.E. 2009. Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 45-53.

Shih, P. C., Huang, C. T. 2002. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 309-314.

Shiner, E. K., Terentyev, D., Bryan, A., Sennoune, S., Martinez-Zaguilan, R., Li, G., Gyorke, S., Williams, S. C., Rumbaugh, K. P. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling. *Cell Microbiol.* 8: 1601-1610.

Simón-Soro, A., Guillen-Navarro, M., Mira, A. 2014. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J. Microbiol.* 6, 25443-25448.

Simón-Soro, A., Mira, A., 2015. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 23:76-82.

Simón-Soro, A., Tomás, I., Carbera-Rubio, R., Catalan, M.D., Nyvad, B., Mira, A. 2013. Microbial geography of the oral cavity. *J. Dent. Res.* 92: 616-621.

Sissons, C.H., Cutress, T.W., Hoofman, M.P., Wakefield, JSJ. 1991. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J. Dent. Res.* 70: 1409-1416.

- Skindersoe, M. E., Ettinger-Epstein, P., Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., De Nys, R., Givskov, M. 2008. Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar. Biotechnol.* 10: 56-63.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25: 134-44.
- Solbiati, J., Frias-Lopez, J. 2018. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease. *J. Dent. Res.* 97: 492-500.
- Soler, A., Arregui, L., Arroyo, M., Mendoza, J.A., Muras, A., Álvarez, C., García-Vera, C., Marquina D., Santos, A., Serrano, S., 2018. Quorum sensing versus quenching bacterial isolates obtained from MBR plants treating leachates from municipal waste. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 15: 1019.
- Stepanovic, S., Vukoci, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40:175-179.
- Sunder, A.V., Utari, P.D., Ramasamy, S., van Merkerk, R., Quax, W., Pundle, A. 2016. Penicillin V acylases from gram-negative bacteria degrade N-acylhomoserine lactonases and attenuate virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 2386-2395.
- Sztajer, H., Lemme, A., Viñchez, R., Schulz, S., Geffers, R., Yip, C.Y.Y., Levesque, C.M., Cvitkovitch, D.G., Wagner-Döbler, I. 2008. Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the *luxS* mutation. *J. Bacteriol.* 190, 401-415.
- Tait, K., Havenhand, J. 2013. Investigating a possible role for the bacterial signal molecules N-acylhomoserine lactones in *Balanus improvisus* cyprid settlement. *Mol. Ecol.* 22: 2588-25602.
- Tait, K., Hutchinson, Z., Thompson, F.L., Munn, C.B. 2010. Quorum sensing signal production and inhibition by coral-associated *Vibrios*. *Environ. Microbiol. Rep.* 2: 145-150.
- Tait., K., Joint, I., Daykin, M., Williams, P., Cámara, M. 2005. Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ. Microbiol.* 7: 229-240.
- Tang, K., Su, Y., Brackman, G., Ciu, F., Zhang, Y., Shi, X., Coenye, T., Zhang, X.H. 2015. MomL, a novel marine-derived N-acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 774-782.
- Tateda, K., Comte, R., Pechere, J. C., Kohler, T., Yamaguchi, K., Delden, C. V. 2001. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1930-1933.
- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J.C., Standiford, T.J., Ishiguro, M., Yamaguchi, K. 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infet. Immun.* 71: 5785-5793
- Taylor, M.W., Shupp, P.J., Baillie, H.J., Charlton, T.S., De Nys, R., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D. 2004. Evidence for acyl homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4387-4389.

Teasdale, M. E., Liu, J., Wallace, J., Akhlaghi, F., Rowley, D. C. 2009. Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 567-572.

ten Cate, J.M. 2006. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology.* 94: 1-9.

Terwagne, M., Mirabella, A., Lemaire, J., Deschamps, C., De Bolle, X., Letesson, J.J. 2013. Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *brucellamelitensis*. *PLoS ONE.* 8: e82514.

Theilade, E. 1986. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 13: 905-911.

Tinh, N. T., Asanka Gunasekara, R. A., Boon, N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2007. *N*-acyl homoserine lactone-degrading microbial enrichment cultures isolated from *Penaeus vannamei* shrimp gut and their probiotic properties in *Brachionus plicatilis* cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 45-53.

Tomasz, A., Hotchkiss, R.D. 1964. Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 51:480-7.

Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., Haghkhah, M., Bossier, P. 2018. Identification of *N*-acyl homoserine lactone-degrading bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* 125: 356-369.

Torres, M., Uroz, S., Salto, R., Fauchery, L., Quesada, E., Llamas, I. 2017. HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family. *Sci. Rep.* 7: 943.

Torres, M., Romero, M., Prado, S., Dubert, J., Tahrioui, A., Otero, A., Llamas, I. 2013. *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve cultures. *Microbiol. Res.* 168: 547-554.

Torres, M., Rubio-Portillo, E., Antón, J., Ramos-Esplá, A.A., Quesada, E., Llamas, I. 2016. Selection of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellopolaris* PQQ-42 and of its potential for biocontrol in aquaculture. *Front. Microbiol.* 7: 646.

Totiam, P., González-Cabezas, Fontana, M.R., Zero, D.T. 2007. A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. *Caries Res.* 41: 467-473.

Turovsky, Y., Chikindas, M.L. 2006. Autoinducer-2 bioassay is a qualitative, not quantitative method influenced by glucose. *J. Microbiol. Methods.* 66, 497-503.

United States Patent and Trademark Office-Patent databases. Disponible en: <http://www.uspto.gov> (Accedido el 5 de septiembre, 2018).

Uroz, S., Chhabra, S. R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P., Dessaux, Y. 2005. *N*-acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiol.* 151: 3313-3322.

Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D., Dessaux, Y. 2003. Novel bacteria degrading *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology.* 149: 1981-1989.

- Uroz, S., Dessaux, Y., Oger, P. 2009. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem.* 10: 205-216.
- Uroz, S., Oger, P. M., Chapelle, E., Adeline, M. T., Faure, D., Dessaux, Y. 2008. A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1357-1366.
- Van Loveren C, Buijss JF, Ten Cate JM. 2003. The effect of triclosan toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model. *J Antimicrobial Chemother.* 45:153-158.
- Van Mooy, B., Hmelo, L., Sofe, L.E., Campagna, S.R., Mau, A.L., Dhyrman, S.T., Heithoff, A., Webb, E., Momper, L., Mincer, T.J. 2012. Quorum sensing control of phosphorous acquisition in *Trichodesmium* consortia. *ISME J.* 6: 422-429.
- Vilchez, R., Lemme, A., Thiel, V., Schulz, S., Sztajer, H., Wagner-Döbler, I. 2007. Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 489-496.
- Wagner-Döbler, I., Thiel, V., Eberl, L., Allgaier, M., Bodor, A., Meyer, S., Ebner, S., Henning, A., Pukall, R., Schulz, S. 2005. Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine Alphaproteobacteria. *Chem. Biochem.* 6: 2195–2206.
- Wahjudi, M., Murugappan, S., van Merker, R., Eiseens, A.C., Visser, M.R., Hinrichs, W.L.J., Quax, W.J. 2013. Development of a dry, stable and inhalable acyl-homoserine-lactone-acylase powder formulation for the treatment of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Eur. J. Phamar Sci.* 48: 637-643.
- Wahjudi, M., Papaioannou, E., Hendrawati, O., van Assen, A. H. G., van Merkerk, R., Cool, R. H., Poelarends, G.J., Quax, W.J. 2011. PA0305 of *Pseudomonas aeruginosa* is a quorum quenching acylhomoserine lactone acylase belonging to the Ntn hydrolase superfamily. *Microbiology.* 157: 2042–2055.
- Wahl, M., Goecke, F., Labes, A., Sobretsov, S., Weinberg, F. 2012. The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Front. Microbiol.* 3:292.
- Walker, C., Sedlacek, M.J. 2007. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol.* 22:152-161.
- Wang, B.Y., Deuthc, A., Hong, J., Kuramitsu, H.K. 2011. Proteases of an early colonizer can hinder *Streptococcus mutans* colonization in vitro. *J. Dent. Res.* 90, 501-505.
- Wang, W.Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N., Ikeda, T. 2010. AiiM, a novel class of *N*-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2524–2530.
- Wang, W.Z., Morohoshi, T., Someya, N., Ikeda T. 2012. AidC, a Novel *N*-Acylhomoserine Lactonase from the Potato Root-Associated *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB) Group Bacterium *Chryseobacterium* sp. Strain StRB126. 78:7985-7992.
- Weigel, W.A., Demuth, D.R. 2015. QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae*. *Molecular Oral Microbiol.* 31: 379-397.

Weiland-Bräuer, N., Pinnow, N., Schmitz, R.A. 2015. Novel reporter for identification of interference with acyl homoserine lactone and autoinducer-2 quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 1477–1489.

Wen, Z.T., Nguyen, A.H., Bitoun, J.P., Abranches, J., Baker, H.V., Burne, R.A. 2011. Transcriptome analysis of LuxS-deficient *Streptococcus mutans* grown in biofilms. *Mol. Oral Microbiol.* 26: 2-18.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., Salmond, G. P. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.

Whittaker, C.J., Klier, C.M., Kolenbrander, P.E. 1996. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:513-552.

Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York. ISBN: 978-3-319-24277-4

Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., Cámara, M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1119-1134.

Winans, S.C., Bassler, B.L. 2002. Mob Psychology. *J. Bacteriol.* 184:873-883.

Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Molin, S., Givskov, M., Hoiby, N. 2004. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob. Chemother.* 53: 1054-1061.

Wynendaele, E., Bronselaer, A., Nielandt, J., D'Hondt, M., Stalmans, S., Bracke, N., Verbeke, F., Van De Wiele, C., De Tré, G., De Spiegeleer, B. 2013. Quorumpeps database: chemical space, microbial origin and functionality of quorum sensing peptides. *Nucleic Acids Res.* 41: D655-D659.

Xie, Y. 2014. *Dynamic documents with R and knitr*. ISBN 978-1482203530. Chapman and Hall/CRC.

Xu, F., Byun, T., Deussen, H. J., Duke, K. R. 2003. Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J. Biotechnol.* 101: 89-96.

Yadav, M.K., Park, S.W., Chae, S.W., Song, J.J. 2014. Sinefungin, a natural nucleoside analogue of S-Adenosylmethionine, inhibits *Streptococcus pneumoniae* biofilm growth. *Biomed Res Int.* 156987.

Yamashita, Y., Takeshita, T. 2017. The oral microbiome and human health. *J. Oral Sci.* 59: 201-206.

Yao, Y., Martinez-Yamout, M.A., Dickerson, T.J., Brogan, A.P., Wright, P.E., Dyson, H.J. 2006. Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *J Mol Biol.* 355:262-273.

Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Cámara, M., Smith, H., Williams, P. 2002. N-acylhomoserine lactonase undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 70: 5635-5646.

Yeon, K.M., Lee, C.H., Kim, J. 2009. Magnetic enzyme carrier for affective biofouling control in a membrane bioreactor based on enzymatic quorum quenching. *Environ. Sci. Technol.* 43: 7403-7409.

Yin, W.F., Purmal, K., Chin, S., Chan, K.Y., Chan, K.G. 2012. Long chain N-acyl homoserine lactone production by *Enterobacter* sp. isolated from human tongue surfaces. *Sensors*. 12: 14307-14314.

Yin, W.F., Purmal, K., Chin, S., Chan, K.Y., Koh, C.L., Sam, C.K., Chan, K.G. 2012. N-acyl homoserine lactone production by *Klebsiella pneumoniae* isolated from human tongue surface. *Sensors*. 12: 3472-3483.

Yoshida, A., Toshihiro, A., Takehara, T., Kuramitsu, H.K. 2005. LuxS-based signalling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2372-2380.

Yost, S., Duran-Pinedo, A.E., Teles, R., Krishnan, K., Frias-Lopez, J. 2015. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med.* 7: 27.

Zang, T., Lee, B.W., Cannon, L.M., Ritter, K.A., Dai, S., Ren, D., Wood, T.K., Zhou, Z.S. 2009. A naturally occurring brominated furanone covalently modifies and inactivates LuxS. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 6200-6204.

Zapata, L.S., Tabarez, M. R., Álvarez, J.C., Escobar, V. V. 2017. Reviewing microbial behaviours in ecosystems leading to a natural quorum quenching occurrence. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 60: e17160295.

Zaura, E., Keijsers, B.J., Huse, S.M., Crielaard, W. 2009. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 9: 259.

Zhang, H. B., Wang, L. H., Zhang, L. H. 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4638-4643.

Zhang, Y., Liu, J., Tang, K., Yu, M., Coenye, T., Zhang, X.H. 2015. Genome analysis of *Flaviramulues ichthyenteri* Th78(T) in the family Flavobacteriaceae: insights into its quorum quenching property and potential roles in fish intestine. *BCM Genomics.* 16: 38.

Ziervogel, K., Arnosti, C. 2008. Polysaccharide hydrolysis in aggregates and free enzyme activity in aggregate-free seawater from the northeastern Gulf of Mexico. *Environ. Microbiol.* 10: 289-299.

Zimmermann, S., Wagner, C., Muller, W., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U., Hansch, G. M. 2006. Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infect. Immun.* 74: 5687-5692.





ANEXO. Publicaciones derivadas de la tesis



Article

High Prevalence of Quorum-Sensing and Quorum-Quenching Activity among Cultivable Bacteria and Metagenomic Sequences in the Mediterranean Sea



ORIGINAL ARTICLE

 OPEN ACCESS

 Check for updates

Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by extracts of *Tenacibaculum* sp. 20J, a bacterium with wide-spectrum quorum quenching activity



1 **Short chain N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules**
2 **promote periodontal pathogens in *in vitro* oral biofilms**

3
4 Andrea Muras¹, Celia Mayer¹, Paz Otero-Casal², Rob A.M. Exterkate³, Bernd
5 W. Brandt³, Wim Crielaard³, Ana Otero^{1#}, Bastiaan P. Krom^{3#},

6 Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía, Facultade de Bioloxía-CIBUS,
7 Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain¹;
8 Centro de Salud Santa Comba/Negreira, EOXI Santiago de Compostela,
9 SERGAS, Santiago de Compostela, Spain², Department of Preventive
10 Dentistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam, University of Amsterdam
11 and Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands².

12 #Corresponding authors: anamaria.otero@usc.es; b.krom@acta.nl

13
14 Keywords: dental plaque, quorum sensing, periodontitis, acylhomoserine
15 lactone

17 **ABSTRACT**

18 Acyl-homoserine-lactones (AHLs), the quorum sensing (QS) signals produced
19 by a range of Gram-negative bacteria, are involved in biofilm formation in many
20 pathogenic and environmental bacteria. Nevertheless, current paradigm
21 excludes a role of AHLs in dental plaque formation, while other QS signals,
22 such as AI-2 and autoinducer peptides, have been demonstrated to play an
23 important role in biofilm formation and virulence-related gene expression in oral
24 pathogens. In the present work we have explored the effect of externally added
25 AHL on *in vitro* oral biofilm models for commensal, cariogenic and periodontal
26 dental plaque. While little effect on bacterial growth was observed, some AHLs
27 specifically affected lactic acid production and protease activity of the biofilms.
28 Most importantly, the analysis of bacterial diversity in the biofilms showed that
29 the addition of C6-HSL results in a shift towards a periodontal bacterial
30 composition profile, by inducing the orange-complex bacteria
31 *Peptostreptococcus* and *Prevotella*. These results point to a relevant role of
32 AHL-mediated QS in dental-plaque formation and might be involved in
33 development of dysbiosis, the mechanism of which should be further
34 investigated. This finding potentially opens new opportunities for the prevention
35 or treatment of the periodontal disease.

36 **IMPORTANCE**

37 Dental plaque is ubiquitous in health, yet the cause of the most common human
38 diseases; caries and gum disease. Dental plaque consists of billions of
39 microbes attached to the surface of your teeth. Communication among these
40 microbes is pivotal for development of these complex community, yet poorly
41 studied in dental plaque. In the presented study we show that a specific
42 communication molecule enhances changes within the community related to
43 development of gum disease. This finding suggests that interfering with
44 microbial communication could represent a novel strategy to prevent gum
45 disease.

46 Introduction

47 Biofilm are sessile microbial communities characterized by cells that are
48 irreversibly attached to a substratum or to each other, embedded in a matrix of
49 self-produced extracellular polymers, and exhibit an altered phenotype with
50 respect to growth rate and gene transcription [1]. Dental plaque is a complex
51 biofilm of oral microorganisms, mainly bacteria and fungi, attached to the tooth
52 surface. In most cases, the oral biofilm is composed of commensal bacteria,
53 creating a harmless or even beneficial microbial community, co-existing with the
54 host in symbiosis. However, in some cases a shift in ecology and associated
55 functions can result in a dysbiosis, and eventually leading a harmful biofilm [2]
56 which is in the origin of the development of major oral diseases, such as caries
57 or gingivitis [3,4]. The complexity of the bacterial community that constitutes the
58 dental plaque is exemplified by the high taxonomic diversity that can be found:
59 between 500-1000 bacterial species have been identified as the core
60 microbiome of the oral cavity, although half of them still remain uncultured [5,6].
61 Most oral bacteria belong to the bacterial phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*,
62 *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Fusobacteria*. Archaea, protozoa, viruses,
63 and fungi are also present in the oral cavity of a healthy adult [7].

64 Plaque formation is a highly dynamic process of ecological succession,
65 regularly reinitiated by our daily oral hygiene measures. Early colonizers adhere
66 to the salivary pellicle where they influence the environmental conditions
67 thereby enabling secondary and late colonizers to grow and become part of the
68 biofilm [8]. Different types of genes with a wide variety of functions are required
69 for the successful establishment and development of dental plaque. In addition
70 to metabolic and physical interactions, a cell-to-cell communication system
71 known as quorum sensing (QS) is involved. Previous studies have reported the
72 production of QS molecules, such as the Autoinducer Peptides (AIP) and AI-2
73 signals in monospecific cultures of different oral pathogens [9-14]. Both Gram-
74 negative and Gram-positive bacteria can synthesize AI-2, known as the
75 “universal” QS signal, which plays a decisive role in multi-species oral biofilm.
76 *LuxS*, the gene responsible of the production of AI-2, is conserved among many
77 species of bacteria, including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,
78 *Streptococcus mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *Porphyromonas gingivalis*, and

79 other oral pathogens [9-12,14]. Several reports point to an important role of this
80 QS signal in dental plaque formation. AI-2 is essential for mutualistic biofilm
81 growth on saliva as sole source of nutrients in co-cultures of *S. oralis* and
82 *Actinomyces naeslundii* [14], both of which do not grow well in monoculture. In
83 addition, *S. gordonii* required the presence of AI-2 to form mixed-species biofilm
84 with the periodontal pathogen *P. gingivalis* [12]. The external addition of partially
85 purified AI-2 from *Fusobacterium nucleatum* both affected biofilm formation in
86 monospecific cultures and multispecies mixtures including *P. gingivalis*,
87 *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*. In presence of AI-2, biofilms
88 showed higher biomass, larger average depth and enhanced co-aggregation
89 between bacteria [15]. In the case of Gram-positive oral pathogens, AIPs, such
90 as competence-stimulating peptide (CSP), have been identified in various oral
91 streptococci, including *S. mutans*, *S. gordonii* and *S. intermedius*. CSP is
92 involved in biofilm formation, bacteriocin synthesis, stress resistance and
93 autolysis [13,16-18].

94 *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) are well-studied QS signals produced by
95 Gram-negative bacteria, although the production of AHLs by the Gram-positive
96 bacterium *Exiguobacterium* MPO was described recently [19]. AHLs contain a
97 homoserine lactone ring (HSL) linked by an amide bond to a fatty acid (between
98 4 and 18 carbons). Despite the widespread ability among Gram-negatives to
99 produce AHLs, attempts to establish production of these QS signals by oral
100 bacteria using different reporter strains have remained unsuccessful [10,20,21].
101 Although the isolation of AHL-producing bacteria from the oral cavity has been
102 reported [22-26] and AHLs seem to influence growth and protein expression in
103 *P. gingivalis* [27,28], it is still generally accepted that AHL-based signaling does
104 not play a major role in dental plaque formation during health and disease.

105 Due to the key role of QS processes for the expression of pathogenic traits,
106 including biofilm formation, the inhibition of QS, a process general known as
107 Quorum Quenching (QQ), has been proposed as an alternative approach for
108 antimicrobial therapy and for controlling pathogenic bacterial behavior to treat or
109 prevent infectious diseases [29]. QQ strategies do not directly interfere with
110 bacterial growth ability and hence, the probabilities of inducing resistance or
111 tolerance against these mechanisms are lower [30,31]. Previous studies have

112 reported the successful use of QS inhibitors to control bacterial biofilms [32-37].
113 Since most QS inhibitors described so far act on AHL-mediated QS circuits, the
114 confirmation of a possible role of AHL-type QS signals in dental-plaque
115 formation would open new perspectives in the prevention and treatment of oral
116 diseases.

117 The aim of the present study was to explore a possible role for AHL-based
118 signaling in dental plaque formation by evaluating the effect of externally added
119 AHL on oral biofilms grown *in vitro*. The effect on pathology-related phenotypes
120 in three different, clinically relevant, *in vitro* oral biofilms models for commensal,
121 cariogenic and periodontal biofilms developed recently [38] was assessed.
122 Lactate production capacity and proteolytic activity were determined as
123 indicators of shifts from commensal towards cariogenic biofilms or periodontal
124 biofilms, respectively [38]. In addition, for a selection of AHLs, the effect on
125 microbial composition of commensal and periodontal biofilms was determined
126 using 16S rDNA sequencing.

127

128 **RESULTS**

129 **Effect of exogenous AHLs on oral biofilm formation**

130 Very small changes were observed in the number of CFUs when the different
131 unsubstituted and oxo-substituted AHLs were added to the culture media in the
132 three oral biofilm models tested, since in no case the difference observed with
133 the respective control biofilm was higher than 1 order of magnitude
134 (Supplementary Figure 1). Still, among the nineteen AHLs tested, the
135 exogenous addition of the long-chain AHLs C16, OC16 and OC18 reduced
136 significantly the formation of the cariogenic biofilms after 48 h of growth ($2.6 \times$
137 10^8 CFUs, 2.4×10^8 CFUs and 2.5×10^8 CFUs respectively, versus 4.3×10^8
138 CFUs for the control biofilms) (Supplementary Figure 1A). When a commensal
139 biofilm was induced, the signal OC6-HSL (9.0×10^7 CFUs) slightly but
140 significantly ($p < 0.05$) reduced the number of CFUs in comparison to the control
141 (1.2×10^8 CFUs) (Supplementary Figure 1B). Lower CFU values were also
142 observed in commensal biofilms when C10 and C12-HSLs were added, but the

143 difference was not statistically significant when compared with the respective
144 controls. Periodontal biofilms were the most sensitive to the exogenous addition
145 of AHLs, since both higher and lower number of CFUs were observed in
146 comparison with the control. In this sense, the short-chain signals C4, C6, OC6
147 and the very long-chain OC18-HSL significantly promoted biofilm formation (6.8
148 $\times 10^7$ CFUs, 1.7×10^8 CFUs, 9.6×10^7 CFUs and 1.0×10^8 CFUs respectively,
149 versus 5.3×10^7 CFUs for the control biofilms) (Supplementary Figure 1C). In
150 contrast, C14-HSL clearly decreased the number of CFUs (2.6×10^7 CFUs
151 versus 7.0×10^7 CFUs for the control biofilms) (Supplementary Figure 1C).

152

153 **Effect of exogenous AHLs on Lactate production**

154 As expected, the cariogenic control biofilms showed the highest levels of lactate
155 production (4.2-9.4 mM) in comparison to commensal control (0.2-2.4 mM) and
156 periodontal control (0.2-2.0 mM) biofilms. Significant effects of the addition of
157 AHLs were observed on lactic acid production in the different oral biofilm
158 models. The addition of medium and long-chain AHLs C8, OC8, C10, OC10-
159 HSL, OC13, C14 and OC14-HSL caused a reduction in the production of lactic
160 acid (72.3%, 50.3%, 77.2%, 48.8%, 72.8%, 81.9% and 81.2 %) in comparison
161 to the control (100%) in cariogenic biofilms. Interestingly, the molecule OC12-
162 HSL caused an increase (123.5%) in the production of lactate (Figure 1, Panel
163 A). Shorter AHLs had no significant effect on lactic acid accumulation in
164 cariogenic biofilms. These effects were not observed when lactic acid
165 production in the control cariogenic biofilms was lower than 7.0 mM, indicating
166 that robust fermentative activity is needed in the biofilm in order to observe the
167 effect of the addition of AHLs. In the case of commensal biofilms, the addition of
168 C8-HSL caused a significant decrease in the production of lactate (20.5%,
169 Figure 1, Panel B). An inhibitory effect on the lactic acid production was also
170 observed in commensal biofilms when the long-chain signals between OC13
171 and C18-HSL were added to the culture media, although being statistically
172 significant only for the latter. The opposite trend seems to be present in the
173 periodontal biofilm where, in general, the long-chain AHLs increased the lactate
174 accumulation while the short ones decreased the lactic acid production (Figure
175 1, Panel C). The addition of OC18-HSL caused a high increase (256.9%) in the

176 lactic acid production in commensal biofilms (Figure 1, Panel B), and the effect
177 was also observed in periodontal biofilms (205.5%) (Figure 1, Panel C). The
178 signal C6-HSL also produced an increase in the lactate accumulation in both
179 commensal and periodontal biofilms. Due to the marginal effects of AHLs on
180 cariogenic biofilms, they were not included in the subsequent sequencing
181 analysis.

182 **Effect of exogenous AHLs on Protease activity**

183 Protease activity was only measured in the commensal and periodontal biofilm
184 models. As expected, the protease activity was higher in periodontal control
185 biofilms (2.3×10^7 - 3.4×10^7 RFU/min) than in commensal control biofilms (7
186 $\times 10^6$ - 2.9×10^7 RFU/min). The addition of several short and long AHLs caused
187 an increase in the protease activity of the commensal biofilm in comparison with
188 the controls, but this increase was only statistically significant for OC6, OC13
189 and C18-HSL (156%, 166.4% and 165.1% versus 100% for control biofilms)
190 (Figure 2, Panel A). On contrary, the protease activity was reduced by OC6 and
191 OC14-HSL in the periodontal biofilm (80% and 52.6 %) and increased by C10-
192 HSL (138.8%) (Figure 2, Panel B).

193 **Effect of exogenous AHLs on Microbial composition**

194 In order to explain the effects observed in the phenotypic assays, the bacterial
195 composition of the biofilms was determined using 16S rDNA sequencing. The
196 control commensal and periodontal biofilms differed significantly in composition
197 (PERMANOVA, $F=6.08$, $p=1e-04$) (Figure 3). The Shannon diversity for the
198 periodontal biofilms was higher than for commensal biofilms (Commensal
199 mean: 2.21 vs. Periodontal mean: 2.38; $p=0.03$). PC1, explaining 27.7% of the
200 variance, separated the commensal and periodontal biofilms and is represented
201 most notably by a differential abundance of OTU5, OTU69 (both *Fusobacterium*
202 species) and OTU17 and OTU18 (*Prevotella* and *Alloprevotella*, resp.).

203 The effects of C6 HSL, OC6 HSL, C8 HSL, OC8 HSL, C18 HSL and OC18 HSL
204 on bacterial composition of commensal and periodontal biofilms were
205 determined and compared with their respective intra-experimental untreated
206 control biofilms. When 1 μ M AHL was added exogenously during growth of
207 commensal biofilms, the community compositions did not shift compared to their

208 respective controls (Figure 4A). In contrast, in the periodontal biofilms, a clear
209 shift was observed upon addition of C6 HSL along the PC1 axis, explaining
210 31.37 % of the variance (Figure 4B).

211 When the effect of C6-HSL was specifically compared to the closely related
212 OC6-HSL, a clear and specific C6-derived shift in community composition was
213 observed (Figure 5). The difference was not significant for the commensal
214 biofilms (data not shown), however it was significant for the periodontal biofilms
215 (PERMANOVA: $F=9.31$, $p=2e-04$). A clear shift along PC1 (explaining 50.1%
216 variance) can be observed. PC1 is represented most notably by a
217 *Peptostreptococcus* species (OTU9), an *Alloprevotella* species (OTU10),
218 *Prevotella* species (OTU23) indicating that these species were largely
219 responsible for the observed shift. Of importance, these species also
220 differentiate commensal biofilms from biofilms grown in periodontal model
221 (Supplementary Figure 2).

222 **DISCUSSION**

223 Cell-to-cell communication is known to play an essential role in microbial
224 pathogenesis coordinating the physiological behavior, biofilm development and
225 virulence of several oral pathogens [53]. In the view of the complexity of the oral
226 microbiota, the characterization of these communication processes is crucial for
227 understanding how oral bacteria interact with each other and for predicting their
228 potential impact on the development of dental-plaque associated oral diseases.
229 Moreover, since the structure and the physiological attributes of biofilms confer
230 an inherent resistance to antimicrobial agents [1], the description of the key
231 factors contributing to the formation of pathogenic oral biofilm may allow the
232 identification of novel targets for the development of new antipathogenic
233 strategies. Current intervention strategies attempt to prevent the initial microbial
234 attachment or penetrate the biofilm matrix and kill the associate cells. However,
235 the future approaches to control bacterial biofilms will be based on inhibition of
236 genes involved in biofilm formation [1], in some cases through the disruption of
237 the QS systems [36,37]. Since most QS inhibitors described so far act on AHL-
238 mediated QS circuits, the confirmation of a possible role of AHL-type QS signals
239 in dental-plaque formation would open new perspectives in the prevention and
240 treatment of oral diseases.

241 Despite the current paradigm excludes a role of the AHL-type QS signals in oral
242 biofilm [53,54], important changes mainly in acid lactic production and protease
243 activity were observed when these QS signals were added. These changes do
244 not seem to be derived from gross quantitative changes in biofilm formation,
245 since the observed differences in biofilm formation, smaller than one log, should
246 not result in a clinically different outcome in the oral cavity [55]. The changes in
247 biofilm formation and metabolic activity observed in the presence of particular
248 exogenous AHLs do not seem to be caused by growth inhibition of bacteria.
249 The potential antimicrobial activity of each AHL on bacterial growth of *S. mutans*
250 was analyzed, but no inhibitory effect was observed (data not shown), therefore
251 supporting the hypothesis that the changes generated in biofilm activity and
252 microbial composition are not derived from growth inhibition. Toxicity of OC12-
253 HSL and its tetramic acid degradation product has been reported for Gram-
254 positive bacteria [56] at concentrations around 10-fold higher than those used in
255 this study. Accordingly, inhibitory activity of oxo-substituted AHL derivatives
256 were not observed in the oral biofilm models (Supplementary Figure 1).

257 While only small changes could be observed in CFU numbers, important
258 changes in the metabolic activities were found after the addition of specific
259 AHLs in the three oral biofilm models. These phenotypic changes without a
260 concurrent large effect on the bacterial growth are typical of a QS-derived gene
261 regulation process. Altogether, these data strongly support the idea of a
262 potential role of the AHL-type QS molecules in the oral cavity. The wide range
263 of responses to the addition of the signals, with biofilm models responding in
264 opposite directions to the addition of very similar AHL signals could be derived
265 from the specificity of some of the QS receptors. It is well known that while the
266 cognate AHL can activate the QS circuits, non-cognate AHLs, even of a very
267 similar structure, may act inhibiting the same receptor [57,58]. The signaling
268 molecules C6, C8, C10 and C16-HSL, which generated the most important
269 changes in the model biofilms, have been previously described in bacteria
270 isolated from the oral environment [23-26]. On the contrary, other signals such
271 as OC6, C18 and OC18-HSL, that showed the highest effect on the studied
272 phenotypes, have not been described in the oral environment so far. Moreover,
273 C14-HSL, one of the AHLs signals that generated changes in the model oral

274 biofilms has been previously reported for causing changes in growth and protein
275 expression in *P. gingivalis* [27]. In that case the concentration used was two
276 orders of magnitude higher than the one used in the present work, 1µM, which
277 is in range with the concentration of QS molecules produced by pathogens [59]
278 and has previously showed effects on the non AHL-producer food borne
279 pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* [60]. Regarding the
280 production of AHLs by oral pathogens, previous studies were unable to obtain
281 evidences of the production of AHLs by *P. gingivalis* and other oral pathogens
282 using the supernatants of monospecific cultures [10,21]. Beyond the limitations
283 of the use of biosensors for the detection of AHLs, it should be taken into
284 account that production of AHLs may change depending on culture medium and
285 conditions [61,62] and also depends on other factors, such as surface
286 attachment or cell-to-cell adherence, that activates AHL synthesis. For example,
287 the gene A1S_0114 of *Acinetobacter baumannii*, encoding a small acidic acyl
288 carrier protein (ACP) essential for AHL synthesis, is expressed at high levels in
289 biofilms and downregulated in planktonic cells [63], further linking cell
290 adherence and QS expression. This could explain that AHLs have not been
291 found so far in pure cultures of oral pathogens.

292 We cannot discard that AHL producers and sensors may play a key role in
293 biofilm formation despite representing a minority in the biofilm community.
294 Some bacteria have LuxR homologs, called LuxR orphans, which do not have
295 an associated LuxI autoinducer synthase but can interact with the autoinducers
296 synthesized by other bacteria [61,64]. As an example, although *E. coli* does not
297 produce AHLs, it possesses a LuxR homolog, called *SdiA*, and uses various
298 AHLs as switches for its regulatory activity [65]. Also, although the AHL-type QS
299 molecules are considered typical of Gram-negative bacteria, previous reports
300 indicate the ability of Gram-positive not only to produce them [19], but also to
301 respond to them [66,67]. In the genome of *Streptococcus mutans*, the predicted
302 product of the *smu.46* gene showed features of the LuxR-family of regulatory
303 proteins, suggesting the existence of a LuxR orphan [67]. Indeed, a previous
304 study with *Staphylococcus aureus* has demonstrated the interaction of this
305 bacterium with the OC12-HSL produced by *Pseudomonas aeruginosa* in a
306 saturable and specific manner, inhibiting the production of exotoxins and

307 enhancing protein-A expression [66]. Additionally, the analysis of the sequence
308 data from 137 oral metagenomes and 700 oral genomes, revealed a high
309 presence of AHL-mediated QS genes (unpublished results). Our results strongly
310 indicate the existence of complex QS networks in the oral biofilm beyond the
311 accepted model in which the oral bacterial communication is mediated by AIPs
312 and AI-2 [53,54].

313 The 16S rDNA sequencing data indicates that exogenous C6 HSL has the
314 ability to change the microbial composition of *in vitro* oral biofilms. Interestingly,
315 OC6-HSL does not induce a similar shift in composition. This specificity of C6-
316 HSL points towards the involvement of a specific C6 HSL binding protein
317 (possibly a receptor) that detects the presence of this signal. Surprisingly, the
318 effect of the addition of C6-HSL on the microbial composition of both,
319 commensal and periodontal biofilms was accompanied by an increase in lactate
320 production in both models (Figure 1). On the contrary, no significant effect was
321 observed on protease activity (Figure 2), indicating that this phenotype is not
322 sensitive enough to allow the detection important shifts in the population. C6-
323 HSL increases the abundance of *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus* and
324 *Prevotella* species in periodontal biofilms, the latter 2 being important members
325 of the Orange Complex as defined by Socransky [68]. This could be a direct
326 effect, for instance by increasing the biofilm-forming capacity of this species.
327 Alternatively, the reduction of the fitness of bacterial species that compete with,
328 or have an antagonistic activity towards, *Peptostreptococcus* and *Prevotella*
329 species could also explain this effect. Further research on the mechanism of the
330 observed increased abundance is needed to determine this. If C6 HSL induces
331 certain periodontal pathogens presence directly, inhibition of C6 HSL sensing
332 could become a viable option to impact the shift from a commensal to a
333 periodontal biofilms. The QQ strategies to prevent the biofilm formation by oral
334 pathogens constitute an attractive alternative since these approaches do not
335 interfere with bacterial growth and hence, the probabilities of inducing
336 resistance or tolerance against these mechanisms are lower. In fact, it has been
337 demonstrated that QQ strategies increase the susceptibility to antibiotics in
338 biofilm-forming pathogens [69-71]. Further studies are required to assess the
339 possible role of the AHL-type QS molecules in the virulence of oral pathogens

340 to explore the viability of the application of these strategies in the field of oral
341 health.

342 The results indicate a potential role of AHLs in development of dysbiosis related
343 to periodontal diseases. Further studies are required to confirm the role of the
344 AHL-type QS molecules in dental plaque formation *in vivo*, which would open
345 the possibility of applying QQ strategies to prevent development of dysbiosis in
346 oral biofilms leading to the development of oral diseases.

347 **MATERIALS AND METHODS**

348 **Test Compounds**

349 QS AHLs type molecules were used at 1 μ M for this study. *N*-butanoyl-L-
350 homoserine lactone (C4-HSL), *N*-hydroxybutanoyl-L-homoserine lactone (OC4-
351 HSL), *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL), *N*-oxohexanoyl-L-
352 homoserine lactone (OC6-HSL), *N*-heptanoyl-L-homoserine lactone (C7-HSL),
353 *N*-octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL), *N*-oxooctanoyl-L-homoserine
354 lactone (OC8-HSL), *N*-decanoyl-L-homoserine lactone (C10-HSL), *N*-
355 oxodecanoyl-L-homoserine lactone (OC10-HSL), *N*-dodecanoyl-L-homoserine
356 lactone (C12-HSL), *N*-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (OC12-HSL), *N*-
357 oxotridecanoyl-L-homoserine lactone (OC13-HSL), *N*-tetradecanoyl-L-
358 homoserine lactone (C14-HSL), *N*-oxotetradecanoyl-L-homoserine lactone
359 (OC14-HSL), *N*-tetradecanoyl-L-homoserine lactone (OC14-HSL), *N*-
360 hexadecanoyl-L-homoserine lactone (C16-HSL), *N*-oxohexadecanoyl-L-
361 homoserine lactone (OC16-HSL), *N*-octadecanoyl-L-homoserine lactone (C18-
362 HSL) and *N*-oxooctadecanoyl-L-homoserine lactone (OC18-HSL). The
363 compounds were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO) and University of
364 Nottingham.

365 **Biofilm formation**

366 Saliva was collected on ice from a single healthy donor as previously described
367 [38]. The saliva was diluted 2-fold with sterile glycerol, aliquoted and stored at -
368 80°C. Biofilms culture units were inoculated with a 50-fold dilution of this saliva
369 stock in the appropriate medium.

370 Biofilms were grown in the Amsterdam Active Attachment model (AAA-model)
371 [39] assembled with round glass coverslips (diameter 12 mm). The model was
372 inoculated with 1.5 mL saliva in one of three culture media [38]: 1) for
373 commensal, buffered semi-defined McBain medium [40](McBain et al., 2005),
374 containing 2.5 g/L mucin, 2 g/L Bacto peptone, 2 g/L trypticase peptone, 1 g/L
375 yeast extract, 0.35 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L CaCl₂, 1 mg/mL hemin, and 2
376 mg/L vitamin K1 with PIPES at pH 7.0, 2) for cariogenic, buffered semi-defined
377 McBain medium with 0.2% sucrose, and 3) for periodontal, buffered semi-
378 defined McBain medium with 10% fetal calf serum (FCS).

379 Cariogenic biofilm grown in presence of sucrose were grown for 48 h, as
380 described previously [38]. Briefly, the AAA-model was inoculated with saliva in
381 McBain medium with 0.2% sucrose and incubated anaerobically at 37°C for 8 h
382 to allow microbes to attach to the glass coverslips. Then, the lid containing the
383 coverslips was transferred to a new plate containing fresh culture media and
384 incubated for another 16 h. The same refreshment routine was used for day 2.
385 Biofilms grown in McBain medium and McBain medium + FCS, were first grown
386 for 8 h, after which the media refreshment was carried out every 24 h, except
387 for the weekends, and the biofilms were harvested after 9 days.

388 **Acid production assay**

389 Lactic acid production by the biofilms was determined prior to harvesting to
390 estimate the cariogenic phenotype [38,39]. The biofilms on coverslips were
391 placed in a 24-well plates containing 1.5 mL of buffered peptone water (BPW)
392 with 0.2% sucrose in each well. Acid formation was allowed for 3 h at 37°C
393 under anaerobic conditions. The amount of lactic acid produced was analyzed
394 using the colorimetric assay described previously [41].

395 **Protease activity**

396 To quantify the protease activity of the biofilms the fluorescence resonance
397 energy transfer (FRET) assay was used [42,43]. The spent medium was filter-
398 sterilized using 0.2 µm filters and stored at -20°C until needed. Wells of clear-
399 bottom 96-well plates were filled with 100 µL of Tris buffered saline (TBS, 50
400 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) and 100 µL of sterile spent medium. Four µL of

401 substrate PEK-054 (800 μ M) were added to each well for a final concentration
402 of 16 μ M. Sterile fresh culture broth was used as control. The fluorescence of
403 each well was read for 2 h with 5 min intervals on a fluorescence microplate
404 reader with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of
405 530 nm. Relative fluorescence (RF) values were obtained after correction
406 against the culture broth control. The protease activity was defined in RF per
407 minute (RF/min). The probe used was PEK-054 [44], a probe for total protease
408 activity. The protease activity was measured in commensal and periodontal
409 biofilms.

410 **Harvesting of biofilms**

411 All biofilms were harvested by transferring the glass coverslips into 2 mL of
412 phosphate buffered saline (PBS), as previously described [38]. Biofilm were
413 sonicated to disperse following the phenotypic assays, to allow CFU
414 determination and subsequent DNA isolation for sequencing analysis.

415 **Biofilm biomass estimation**

416 The colony forming units (CFUs) were determined to estimate biofilm formation
417 [38,39]. Serial dilutions in cysteine peptone water (CPW) of the dispersed
418 biofilms were plated on tryptic soy agar blood plates (TSA-b). Plates were
419 incubated anaerobically for 96 h at 37°C and the CFUs were counted. Since not
420 all AHLs could be tested simultaneously for each model, results are expressed
421 as percentage with respect to the corresponding control. Average CFU values
422 for control cultures were $6.47 \times 10^7 \pm 2.57 \times 10^7$ for cariogenic, $8.59 \times 10^7 \pm 4 \times 10^7$
423 for commensal and $1 \times 10^8 \pm 0.8 \times 10^8$ for periodontal biofilms.

424 *DNA isolation and microbiome analysis*

425 Commensal and periodontal biofilms were used for microbiome analysis. Total
426 DNA was isolated and purified as previously described [38]. Bacterial DNA
427 concentration was determined by qPCR, using a universal primer-probe set
428 targeting the 16S rRNA gene [45]. Next, 1 ng of DNA was used to amplify the
429 V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene as described previously [46]
430 except that 33 amplification cycles were performed. The amplicons were pooled
431 equimolarly and purified from agarose gel (Illustratm, GE Healthcare, UK).

432 Paired-end reads of 251 nt were generated using the Illumina MiSeq platform
433 and Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) at the
434 VUmc Cancer Center Amsterdam (Amsterdam, the Netherlands). The
435 sequence data was processed as described previously [47], however, 10%
436 mismatches in the overlap here translates to a maximum of 25 mismatches.

437 **Sequencing data analysis**

438 The OTU table was randomly subsampled at 11,000 reads/sample and in R
439 v3.5.1 [48] using the R packages microbiome v1.4.0 [49], phyloseq v1.26.0 [50]
440 and vegan v2.5-3 [51]. The OTU table was log₂ transformed to ordinate the
441 data by principal component analysis (PCA) into two dimensions. The PCA
442 coordinates were eigenvalue scaled. Plots were generated with ggplot2 v.3.1.0
443 [52].

444 **Statistical analysis**

445 A Welch's t-test was performed to determine the statistical significance of the
446 effect of the addition of each AHL on biofilm formation (CFUs), lactic acid
447 production and protease activity between the control and the treated wells.
448 Significant differences were determined at $p < 0.05$.

449 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) using the Bray-
450 Curtis distance was performed in R on the transformed OTU table with using
451 (9999 permutations). Differences in Shannon diversities were tested in R using
452 the Wilcoxon rank sum (Mann-Whitney).

453

454

455 **Acknowledgment**

456 This work was supported by the grant "Axudas do Programa de Consolidación e
457 Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas (GPC)" from the
458 Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia
459 (ED431B2017/53). A.M. was supported by a predoctoral fellowship from the
460 Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia

461 (ED481A-2015/311) and the Real Academia Galega de Ciencias (Premio á
462 Transferencia de Tecnoloxía en Galicia 2017). B.P.K. was supported by a UvA
463 focal point grant on Oral Infection and Inflammation.

464 **References**

465 1. Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically
466 relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15:167-193.

467 2. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A,
468 Pignatelli M, Mira A. 2012. The oral metagenome in health and disease. *ISME*
469 *J.* 6:46-56.

470 3. Marsh PD. 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in
471 health and disease. *Adv Dent Res.* 8:263-271.

472 4. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. 2012. The keystone-pathogen
473 hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 10:717-725.

474 5. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the
475 normal bacteria flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 43: 5721-5732.

476 6. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. 2009. Defining the healthy “core
477 microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 9:259.

478 7. Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and
479 diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 486:207-214

480 8. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. 2010. Bacterial
481 interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000.
482 42:47-49.

483 9. Fong KP, Chung WO, Lamont RJ, Demuth DR. 2001. Intra- and interspecies
484 regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS.
485 *Infect Immun.* 69:7625-7634.

486 10. Burgess NA, Kirke DF, Williams P, Winzer K, Hardie KR, Meyers NL,
487 Aduse-Opoku J, Curtis MA, Cámara M. 2002. LuxS-dependent quorum sensing
488 in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities
489 but is not essential for virulence. *Microbiology.* 148:763-772.

- 490 11. Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH, Shi W. 2003. Mutation of *luxS*
491 Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 71:1972–
492 1979.
- 493 12. McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, Barbieri B, Cook GS, Lamont RJ. 2003.
494 Lux-S based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls
495 carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*.
496 *J Bacteriol.* 185:274-284.
- 497 13. Petersen FC, Pecharki D, Scheie AA. 2004. Biofilm mode of growth of
498 *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling
499 peptide. *J Bacteriol.* 186:6327-6331.
- 500 14. Rickard AH, Palmer RJ, Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF,
501 Eglund PG, Bassler BL, Kolenbrader PE. 2006. Autoinducer 2: a concentration-
502 dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol.*
503 60:1446-56.
- 504 15. Jang YJ, Choi YJ, Lee SH, Jun HK, Choi BK. 2013. Autoinducer 2 of
505 *Fusobacterium nucleatum* as a target molecule to inhibit -biofilm formation of
506 periodontopathogens. *Arch Oral Biol.* 58:17-27.
- 507 16. Senadheera D, Cvitkovitch DG. 2008. Quorum sensing and biofilm
508 formation by *Streptococcus mutans*. *Adv Exp Med Biol.* 631:178-188.
- 509 17. Perry JA, Cvitkovitch DG, Levesque CM. 2009. Cell death in *Streptococcus*
510 *mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol*
511 *Lett.* 299:261-266.
- 512 18. Senadheera D, Krastel K, Mair R, Persadmeht A, Abranches J, Burne RA,
513 Cvitkovitch DG. 2009. Inactivation of VicK affects acid production and acid
514 survival of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 191:6415-6424.
- 515 19. Biswa P, Doble M. 2013. Production of acylated homoserine lactone by
516 gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS Microbiol Lett* 343:34-
517 41.
- 518 20. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. 1996. Mechanisms of adhesion
519 by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 50:513-552.

- 520 21. Frias J, Olle E, Alsina M. 2001. Periodontal pathogens produce quorum
521 sensing signal molecules. *Infect Immun.* 69:3431-3434.
- 522 22. Yin WF, Purmal K, Chin S, Chan KY, Chan KG. 2012. Long chain N-acyl
523 homoserine lactone production by *Enterobacter* sp. isolated from human tongue
524 surfaces. *Sensors.* 12:14307-14314.
- 525 23. Yin WF, Purmal K, Chin S, Chan KY, Koh CL, Sam CK, Chan KG. 2012. N-
526 acyl homoserine lactone production by *Klebsiella pneumoniae* isolated from
527 human tongue surface. *Sensors.* 12:3472-3483.
- 528 24. Chen JW, Chin S, Tee KK, Yin WF, Choo YM, Chan KG. 2013. N-acyl
529 homoserine lactone-producing *Pseudomonas putida* strain T2-2 from human
530 tongue surface. *Sensors.* 13:13192-13203.
- 531 25. Goh SY, Tan WS, Khan SA, Chew HP, Kasim NHA, Yin WF, Chan KG.
532 2014. Unusual multiple production of N-acylhomoserine lactones a by
533 *Burkholderia* sp. strain C10B isolated from dentine caries. *Sensors.* 14:8940-
534 8949.
- 535 26. Goh SY, Khan SA, Tee KK, Kasim NHA, Yin WF, Chan KG. 2016. Quorum
536 sensing activity of *Citrobacter amalonaticus* L8A, a bacterium isolated from
537 dental plaque. *Sci Rep.* 6:20702.
- 538 27. Komiya-Ito A, Ito T, Yamanaka A, Okuda K, Yamada S, Kato T. 2006. N-
539 tetradecanoyl homoserine lactone, signaling compound for quorum sensing,
540 inhibits *Porphyromonas gingivalis* growth. *Research J Microbiol.* 1:353-359.
- 541 28. Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S. 2010. Effects of N-
542 acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm
543 formation. *J Periodont Res.* 45:255-261.
- 544 29. Romero M, Mayer C, Muras A, Otero A. 2015. Silencing bacterial
545 communication through enzymatic quorum sensing inhibition, pp. 219-236. *In*
546 Kalia VC (ed), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: a battle with no end in*
547 *sight*, Springer, India.
- 548 30. García-Contreras R, Maeda T, Wood TK. 2016. Can resistance against
549 quorum-sensing interference be selected? *ISME J.* 10:4-10.

- 550 31. Guendouze A, PLener L, Bzdrenga J, Jacquet P, Rémy B, Elias M, Lavigne
551 JP, Daudé D, Chabrière E. 2017. Effect of quorum quenching lactonase in
552 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum
553 sensing inhibitors. *Front Microbiol.* 8:227.
- 554 32. Yeon KM, Lee CH, Kim J. 2009. Magnetic enzyme carrier for affective
555 biofouling control in a membrane bioreactor based on enzymatic quorum
556 quenching. *Environ Sci Technol.* 43:7403-7409.
- 557 33. Kim JH, Choi DC, Yeon KM, Kim SR, Lee CH. 2011. Enzyme-immobilized
558 nanofiltration membrane to mitigate biofouling based on quorum quenching.
559 *Environ Sci Technol.* 45:1601-1607.
- 560 34. Oh HS, Yeon KM, Yang CS, Kim SR, Lee CH, Park SY, Han JY, Lee JK.
561 2012. Control of membrane biofouling in MBR for wastewater treatment by
562 quorum quenching bacteria encapsulated in microporous membrane. *Environ*
563 *Sci Technol.* 46:4877-4884.
- 564 35. Lade H, Paul D, Kweon JH. 2014. Quorum Quenching mediated
565 approaches for control of membrane biofouling. *Int J Biol Sci.* 10:550-565.
- 566 36. Ivanova K, Fernandes MM, Francesko A, Mendoza E, Guezquez J, Burnet,
567 M, Tzanov T. 2015. Quorum-Quenching and matrix-degrading enzymes in
568 multilayer coatings synergistically prevent bacterial biofilm formation on urinary
569 catheters. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:27066–27077.
- 570 37. Muras A, Mayer C, Romero M, Camino T, Ferrer MD, Mira A, Otero A.
571 2018. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilms formation by extracts of
572 *Tenacibaculum* sp. 20J, a bacterium with wide-spectrum quorum quenching
573 activity. *J Oral Microbiol.* 10:1.
- 574 38. Janus MM, Kaijser BJ, Bikker FJ, Exterkate RA, Crielaard W, Krom BP.
575 2015. In vitro phenotypic differentiation towards commensal and pathogenic oral
576 biofilms. *Biofouling.* 31:503-510.
- 577 39. Exterkate RA, Crielaard W, Ten Cate JM. 2010. Different response to amine
578 fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-
579 throughput active attachment model. *Caries Res.* 44:372-379.

- 580 40. McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P.
581 2005. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. J
582 Appl Microbiol. 98:624-634.
- 583 41. Van Loveren C, Buijjs JF, Ten Cate JM. 2003. The effect of triclosan
584 toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model. J
585 Antimicrobial Chemother. 45:153-158.
- 586 42. Kaman WE, Hulst AG, van Alphen PT, Roffel S, van der Schans MJ, Merkel
587 T, van Belkum A, Bikker FJ. 2011. Peptide-based fluorescence resonance
588 energy transfer protease substrates for the detection and diagnosis of *Bacillus*
589 species. Anal Chem. 83:2511-2517.
- 590 43. Kaman WE, Galassi F, de Soet JJ, Bizarro S, Loos BG, Veerman EC, van
591 Belkum A, Bikker FJ. 2012. Highly specific protease-based approach for
592 detection of *Porphyromonas gingivalis* in diagnosis of periodontitis. J Clin
593 Microbiol. 50:104-112.
- 594 44. Cummings RT, Salowe SP, Cunningham BR, Wiltsie J, Park YW, Sonatore
595 LM, Wisniewski D, Douglas CM, Hermes JD, Scolnick EM. 2002. A peptide-
596 based fluorescence resonance energy transfer assay for *Bacillus anthracis*
597 lethal factor protease. Proc Natl Acad Sci USA. 99:6603-6606.
- 598 45. Ciric L, Pratten J, Wilson M, Spratt D. 2010. Development of a novel multi-
599 triplex qPCR method for the assessment of bacterial community structure in oral
600 populations, Environ Microbiol Rep 2:770-774.
- 601 46. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A,
602 Bradshaw D, Lambert M, Malcolm J, Buijs MJ, Zaura E, Crielaard W, Brandt
603 BW, Ramage G. 2015. The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced
604 by Levels of Natural Dentition. PLoS One 10:e0137717.
- 605 47. Koopman JE, Buij MJ, Brandt BW, Keijser BJ, Crielaard W, Zaura E. 2016.
606 Nitrate and the Origin of Saliva Influence Composition and Short Chain Fatty
607 Acid Production of Oral Microcosms, Microb Ecol.72:479-492.
- 608 48. R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical
609 computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL
610 <https://www.R-project.org/>

- 611 49. Leo Lahti et al. 2017. Bioconductor. Tools for microbiome analysis in R.
612 Microbiome package version 1.4.0. URL:
613 <http://microbiome.github.io/microbiome>
- 614 50. McMurdie PJ, Holmes S. 2013. phyloseq: [An R Package for Reproducible](#)
615 [Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data](#). PLoS ONE.
616 8:e61217.
- 617 51. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D,
618 Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E,
619 Wagner H. 2018. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-
620 6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- 621 52. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag,
622 New York, 2016. ISBN: 978-3-319-24277-4
- 623 53. Guo L, He X, Shi W. 2014. Intercellular communications in multispecies oral
624 microbial communities. Front Microbiol. 5:328.
- 625 54. Jakubovics NS, Kolenbrander PE. 2010. The road to ruin: the formation of
626 disease-associated oral biofilms. Oral Diseases. 16:729-739.
- 627 55. Janus MM, Crielaard W, Zaura E, Keijser BJ, Brandt BW, Krom BP. 2016. A
628 novel compound to maintain a healthy oral plaque ecology in vitro. J Oral
629 Microbiol. 8: 32513.
- 630 56. Kaufmann GF, Sartorio R, Lee SH, Rogers CJ, Meijler MM, Moss JA,
631 Clapham B, Brogan AP, Dickerson TJ, Janda KD. 2005. Revisiting quorum
632 sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-
633 acylhomoserine lactones. Proc Natl Acad Sci USA. 102:309-314.
- 634 57. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Cámara M, Daykin
635 M, Lamb JH, Swift S, Bycroft B, Gordon SA, Stewart GS, Williams P. 1997.
636 Microbiology. 143:3703-3711.
- 637 58. McLean RJ, Pierson LS 3rd, Fuqua C. 2004. A simple screening protocol for
638 the identification of quorum signal antagonists. J Microbiol Methods. 58:351-
639 360.
- 640 59. Romero M, Muras A, Mayer C, Buján N, Magariños B, Otero A. 2014. In
641 vitro quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using

642 marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts. Dis Aquat Org.
643 108:217-225.

644 60. Bai JA, Rai VR. 2016. Effect of small chain N acyl homoserine lactone
645 quorum sensing signals on biofilms of food-borne pathogens. J Food Sci
646 Technol. 53:3609-3614.

647 61. Muras A, López-Pérez M, Mayer C, Parga A, Amaro-Blanco J, Otero A.
648 2018. High prevalence of quorum-sensing and quorum-quenching among
649 cultivable bacteria and metagenomic sequences in the Mediterranean Sea.
650 Genes. 9:100.

651 62. Mayer C, Muras A, Romero M, Rumbo-Leal S, López Días M, Tomás M,
652 Otero A. 2018. Multiple quorum quenching enzymes are active in the
653 nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC17978. Front Cell Infect
654 Microbiol. 8:310.

655 63. Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP,
656 Aransay AM, Rodríguez-Ezpeleta N, Fullaondo A, Valle J, Tomás M, Bou G,
657 Poza M. 2013. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii*
658 assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in
659 biofilm compared to planktonic cells. PLoS One. 8:e72968.

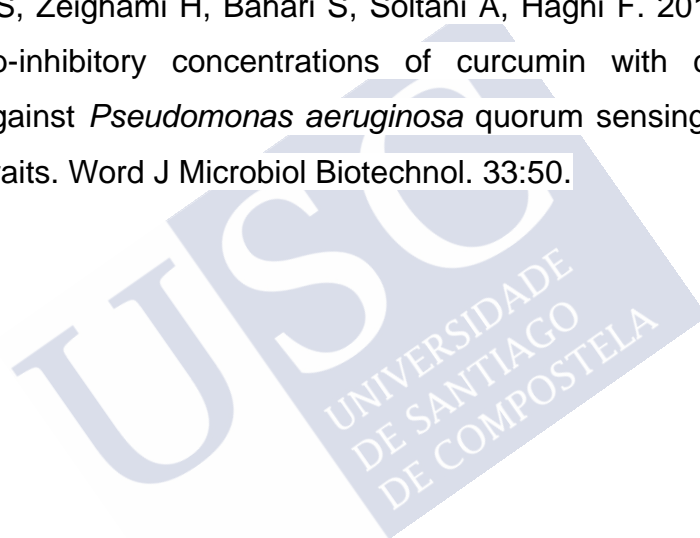
660 64. Patankar AV, González JE. 2009. Orphan LuxR regulators of quorum
661 sensing. FEMS Microbiol Rev. 33:739-756.

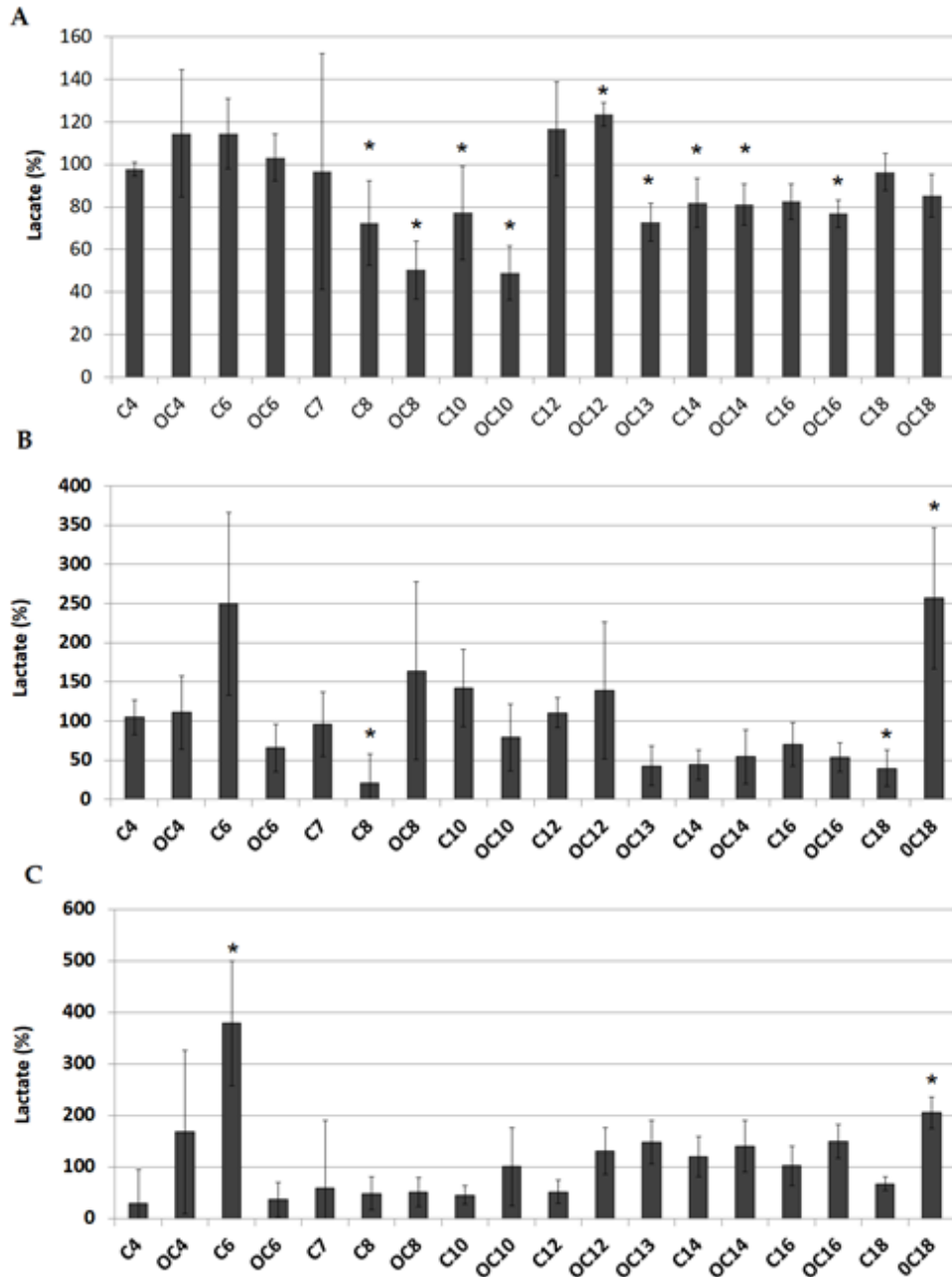
662 65. Yao Y, Martinez-Yamout MA, Dickerson TJ, Brogan AP, Wright PE, Dyson
663 HJ. 2006. Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA:
664 activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. J Mol Biol.
665 355:262-273.

666 66. Qazi S, Middleton B, Muharram SH, Cockayne A, Hill P, O'Shea P,
667 Chhabra SR, Cámara M, Williams P. 2006. N-Acylhomoserine lactones
668 antagonize virulence gene expression and Quorum sensing in *Staphylococcus*
669 *aureus*. Infect Immun. 74:910-919.

670 67. Wen ZT, Nguyen AH, Bitoun JP, Abranches J, Baker HV, Burne RA. 2011.
671 Transcriptome analysis of LuxS-deficient *Streptococcus mutans* grown in
672 biofilms. Mol Oral Microbiol. 26:2-18.

- 673 68. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. 1998.
674 Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 25:134-44.
- 675 69. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. 2011. Quorum sensing
676 inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro
677 and in vivo. Antimicrob Agents Chemother. 55:2655-2661.
- 678 70. Simonetti O, Cirioni O, Cacciatore I, Baldassarre L, Orlando F, Pierpaoli E,
679 Lucarini G, Orsetti E, Provinciali M, Fornasari E, Di Stefano A, Giacometti A,
680 Offidani A. 2016. Efficacy of the quorum sensing inhibitor FS10 alone and in
681 combination with tigecycline in an animal model of Staphylococcal infected
682 wound. PLoS One. 11:e0151956.
- 683 71. Roudashti S, Zeighami H, Bahari S, Soltani A, Haghi F. 2017. Synergistic
684 activity of sub-inhibitory concentrations of curcumin with ceftzidime and
685 ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing related genes
686 and virulence traits. Word J Microbiol Biotechnol. 33:50.
- 687

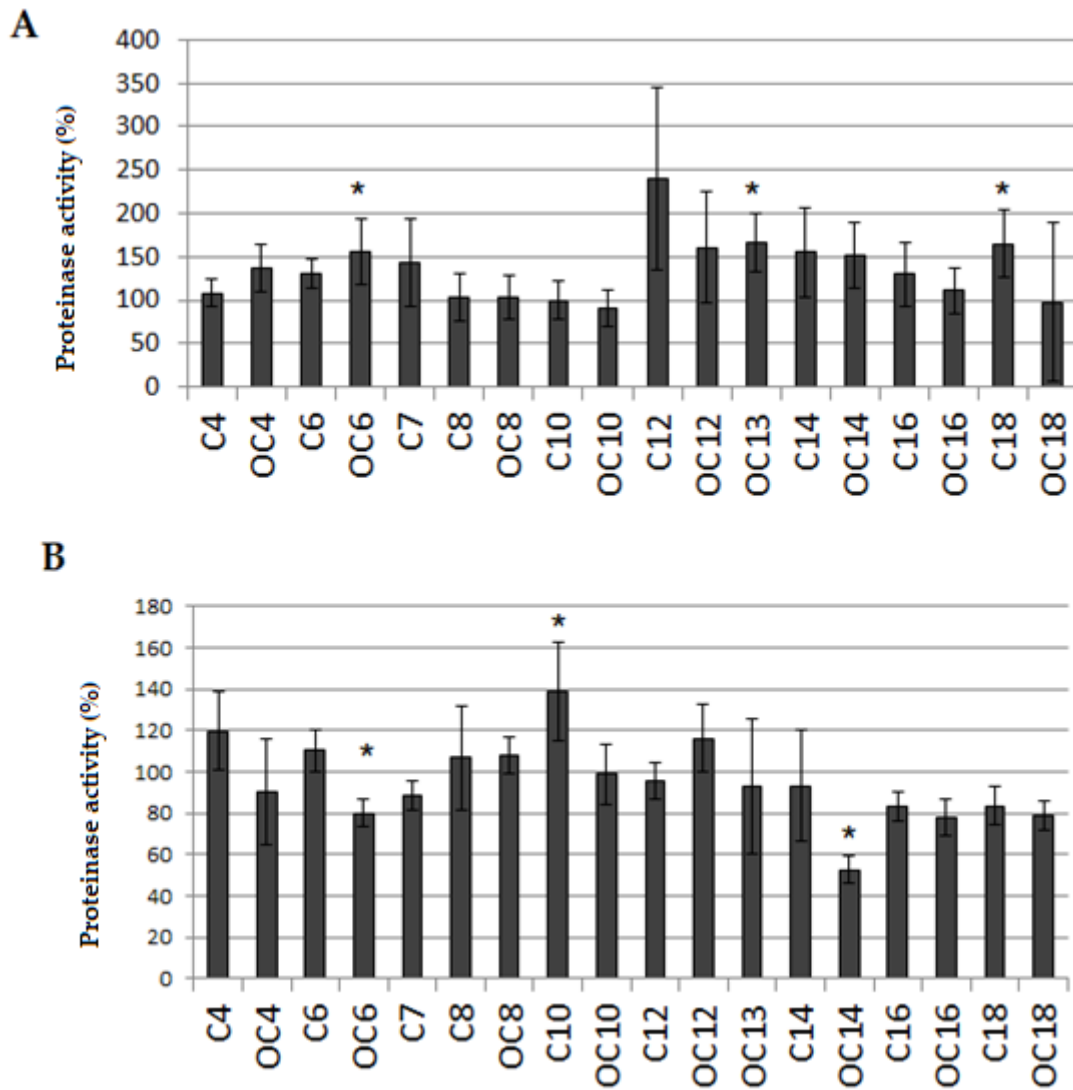




688

689 **Figure 1.** Effect of the AHLs (1 μ M) on lactate accumulation (% in comparison
 690 to control cultures) in cariogenic (Panel A), commensal (Panel B) and
 691 periodontal (Panel C) biofilms. The increase observed when the signal OC18-
 692 HSL is added on commensal and periodontal model biofilm was confirmed in a
 693 second independent experiment. Data are presented as means \pm SD (n=4). *
 694 indicates significant difference compared to untreated controls (Welch's Test,
 695 $p < 0.05$).

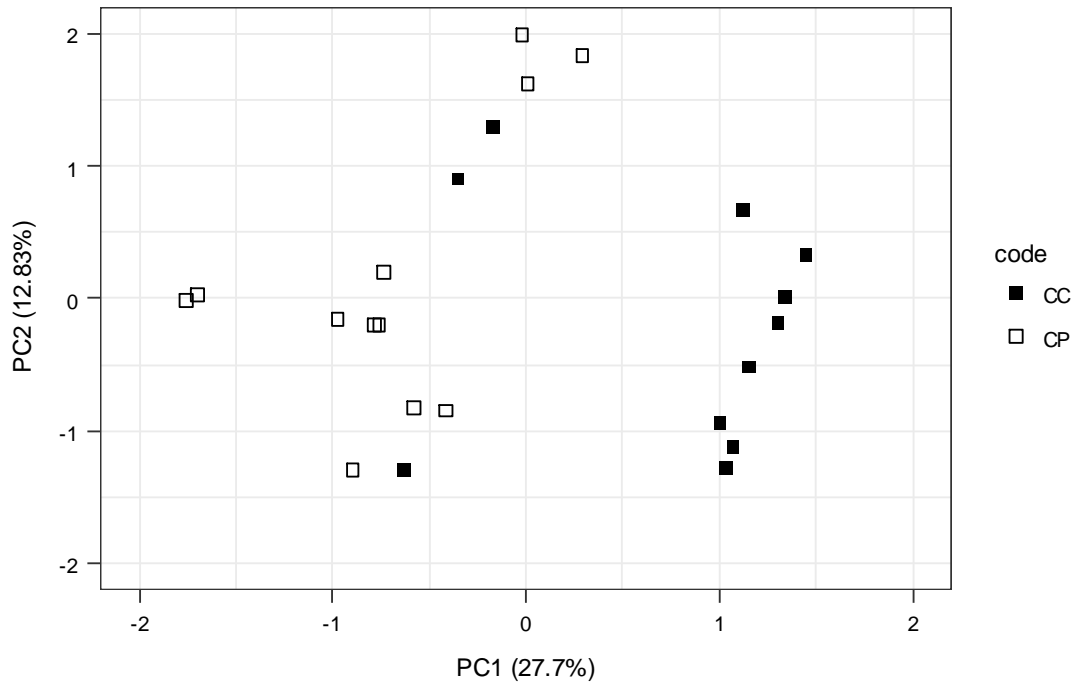
696



697

698 **Figure 2.** Effect of the addition of AHLs (1 μ M) on protease activity (%) in
 699 commensal (Panel A) and periodontal (Panel B) biofilms. Data are presented as
 700 means \pm SD (n=4) (Welch's Test, $p < 0.05$). * indicates significant difference
 701 compared to untreated controls.

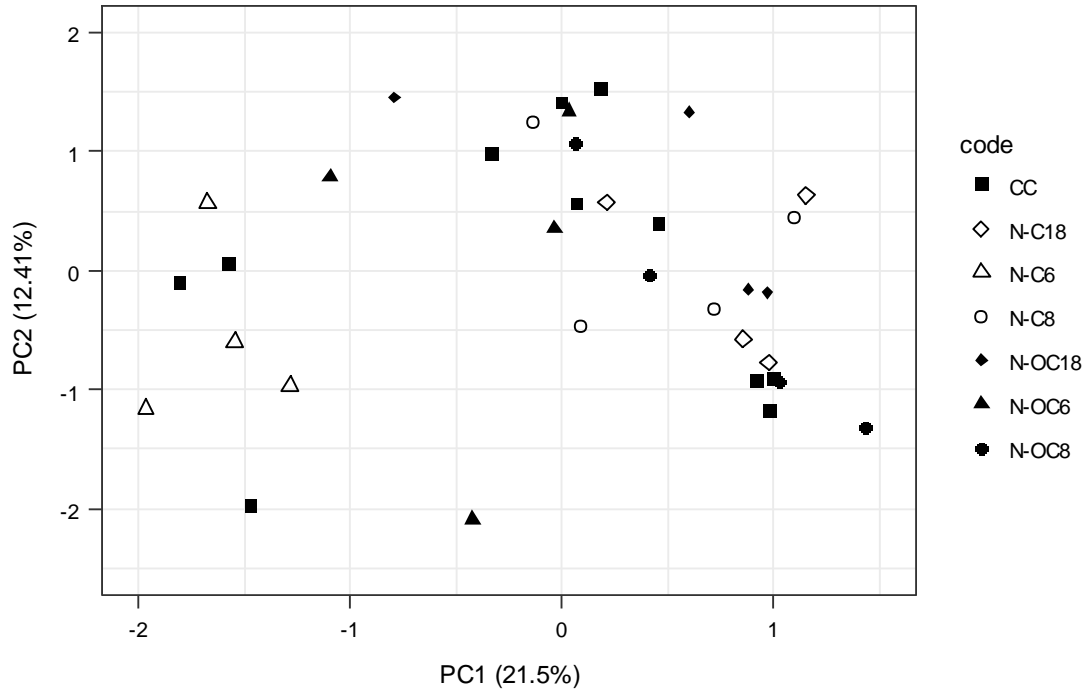
702



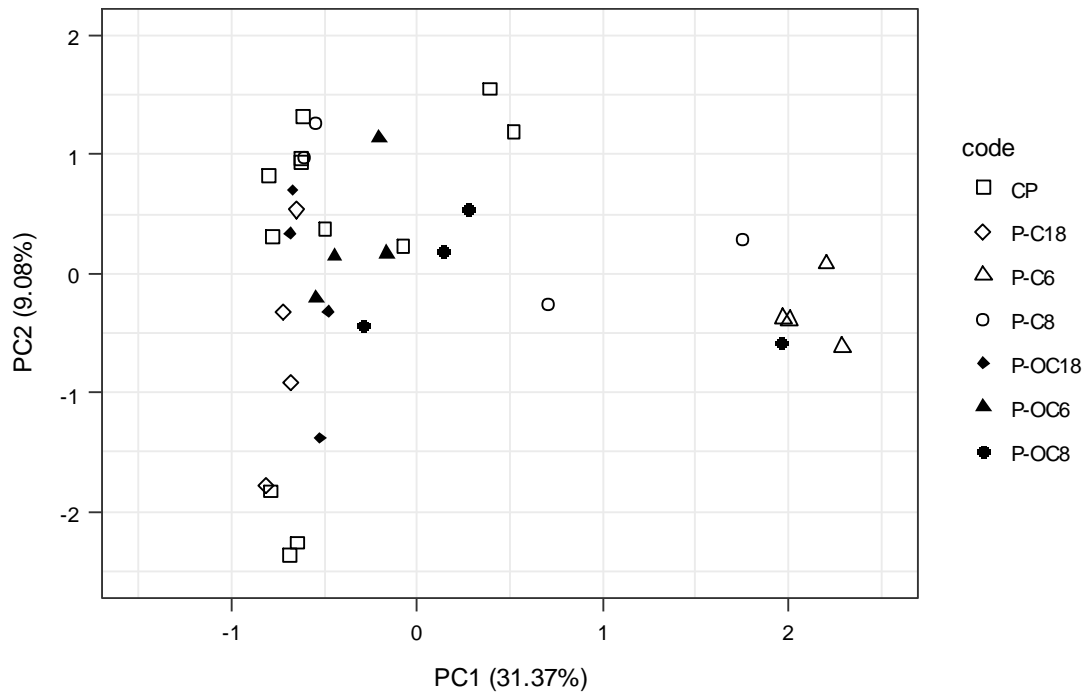
703

704 **Figure 3.** Comparison of the species composition between *in vitro* commensal
 705 (control commensal, CC) and periodontal (control periodontal, CP) biofilms from
 706 3 independent experiments performed over a period of 3 weeks. Principal
 707 component analysis of commensal biofilms (black squares) and periodontal
 708 biofilms (open squares) grown without exogenously added AHLs. PC1,
 709 explaining 27.7% of the variance, separated the commensal and periodontal
 710 biofilms (PERMANOVA, F=6.08, p=1e-04).

711

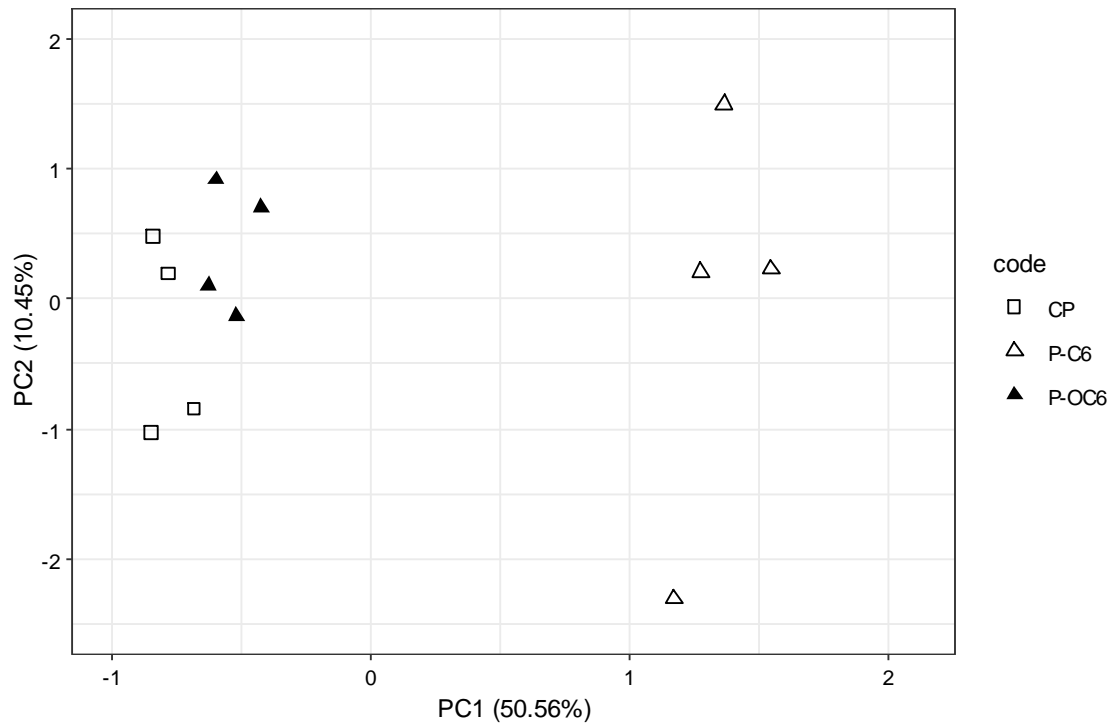


712



713

714 **Figure 4.** The effect of 1 μM exogenously added AHL on species composition
 715 of commensal (Panel A) and periodontal (Panel B) biofilms grown. The squares
 716 represent the untreated controls in both types of biofilms (closed in commensal,
 717 open in periodontal). Open symbols represent the C variant of the HSL while
 718 closed symbols represent the OC variant of the HSL. Triangles = C6/OC6 HSL,
 719 circles = C8/OC8 HSL and diamonds = C18/OC18 HSL in both panels.



720

721 **Figure 5.** Comparison of the effect of C6 and OC6 HSL on the species
 722 composition of periodontal biofilms. A clear shift along PC1, explaining 50.6%
 723 variance in periodontal biofilms, can be observed. The 3 groups differed
 724 significantly (PERMANOVA, $F=9.31$, $p=2e-04$).