



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL**

**CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UNA
BACTERIOCINA AISLADA DE *Limosilactobacillus reuteri*, EN
MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CARIES Y SALUD**

Juan Luis Ravelo Ramírez

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Claudia Lefimil Puente**

**TUTORES ASOCIADOS
Dra. Carla Lozano Moraga
Dr. Oscar Almarza Pizarro**

**Adscrito a Proyecto PRIODO 2021/14
Santiago - Chile
2022**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL**

**CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UNA
BACTERIOCINA AISLADA DE *Limosilactobacillus reuteri*, EN
MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CARIES Y SALUD**

Juan Luis Ravelo Ramírez

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Claudia Lefimil Puente**

**TUTORES ASOCIADOS
Dra. Carla Lozano Moraga
Dr. Oscar Almarza Pizarro**

**Adscrito a Proyecto PRIODO 2021/14
Santiago - Chile
2022**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todo el esfuerzo que han realizado sobre mí desde que tengo memoria. Por su apoyo y preocupación en el camino que he recorrido y por estar siempre pendientes de las dificultades que he tenido sobre éste. Gracias por su confianza y sobre todo por su amor incondicional hacia mí. Son lo más preciado que tengo en la vida y les estoy infinitamente agradecido de todo lo que me han dado, así que este logro está dedicado para ustedes. Los amo mucho.

A mi hermana Sofía, mis tíos, primos y abuelos que forman mi familia. Gracias por quererme de la forma que soy y entregarme también su apoyo incondicional. A mis ojos son el reflejo de lo que es una familia unida, linda y llena de amor, y no podría ser más feliz de formar parte de ello. Ustedes son lo que siento como mi hogar.

A mi docente tutora, Dra. Claudia Lefimil, por ser una persona maravillosa y una profesional formidable. Gracias por la dedicación, el tiempo y preocupación que me ha otorgado, y por dejarme ser parte de este proyecto de investigación. Su calidad humana y empatía es algo de lo que siempre le agradeceré y ruego que siga siempre así.

A mis amigos Benjamín, Felipe, Matías, Joel y Johanny, con los que he formado lazos muy unidos y bellos. Gracias por haberme acompañado estos años y por todos los momentos que vivimos. Los quiero muchísimo, son increíbles.

A mi amigo Francisco, por ser el pilar emocional más importante que he tenido y que me ayudó en los momentos más difíciles. Eres el mejor amigo que me regaló la vida, nunca voy a dejar de agradecerte de todo hasta mi último día.

A todos mis amigos que encontré en el camino, tanto en el colegio como en la universidad. Gracias por las aventuras, alegrías y el ánimo que me dieron a lo largo del recorrido; y por llenar mi corazón cada vez que me devolvieron una sonrisa amable al verlos.

A todos ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Microbiota y salud oral	3
2.2. Microbiota y caries dental	4
2.3. Probióticos en caries dental	5
2.4. <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	8
2.5. Bacteriocinas	10
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVO GENERAL	12
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1. Análisis <i>in silico</i> de los genomas disponibles de <i>L. reuteri</i>	13
6.2. Caracterización <i>in silico</i> de la(s) bacteriocina(s)	13
6.3. Cepas bacterianas y cultivos microbiológicos	13
6.4. Purificación y cuantificación de bacteriocina(s) por RP-HPLC	14
6.5. Análisis del efecto de la bacteriocina en el crecimiento de distintos microorganismos.	15
6.6. Determinación de la concentración inhibitoria media máxima de la bacteriocina en distintos microorganismos	16
6.7. Análisis estadísticos	16
7. RESULTADOS	17
7.1. Análisis <i>in silico</i> sobre la presencia de bacteriocina(s) en el genoma de <i>L. reuteri</i>	17
7.2. Caracterización <i>in silico</i> de la bacteriocina	18
7.3. Obtención de la bacteriocina por RP-HPLC	18
7.4. Efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de <i>L. casei</i> ATCC 4646	19

7.5. Efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de <i>S. mutans</i> ATCC 25175	
21	
7.6. Efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de <i>S. sanguinis</i> SK36	22
7.7. Concentración inhibitoria media máxima de la bacteriocina sobre <i>L. casei</i> ATCC 4646	23
7.8. Concentración inhibitoria media máxima de la bacteriocina sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175	24
7.9. Concentración inhibitoria media máxima de la bacteriocina sobre <i>S. sanguinis</i> SK36	25
8. DISCUSIÓN	26
9. CONCLUSIONES	32
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
11. ANEXOS	44
11.1. Anexo 1. Tabla 3. Tabla comparativa de las 137 secuencias de bacteriocinas de la base de datos BactiBase y el alinamiento con el genoma de <i>L. reuteri</i> ATCC 5289 a través del software BLASTp.	44
11.2. Anexo 2. Estadísticas y parámetros estructurales de la secuencia de Plantaricina-A hallada en el genoma de <i>L. reuteri</i> ATCC 5289 a través del programa EMBOSS Pepstats.	56
11.3. Anexo 3. Certificado de inscripción de proyecto PRIODO	57

1. RESUMEN

Introducción: La etiología de la caries dental comprende una modulación constante en la biopelícula microbiana, en donde diversas investigaciones han determinado el rol de múltiples bacterias tanto en salud oral como enfermedad. La especie probiótica *Limosilactobacillus reuteri* ha demostrado presentar actividad anticariogénica sin comprenderse completamente su mecanismo de acción sobre otros microorganismos; aunque se ha propuesto que se debe a la producción de bacteriocinas, péptidos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana.

Objetivo: Identificar la presencia y caracterizar una bacteriocina producida por *L. reuteri* ATCC 5289, determinando su actividad antibacteriana sobre microorganismos asociados a salud oral y enfermedad de caries.

Materiales y métodos: Se determinó *in silico* la presencia de una bacteriocina en los genomas disponibles de *L. reuteri*, a través de programas de alineamiento de secuencias genéticas y bases de datos de bacteriocinas. La molécula fue purificada y cuantificada desde el sobrenadante de cultivo de *L. reuteri* ATCC 5289, mediante RP-HPLC. Se cultivó *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus casei* ATCC 4646 y *Streptococcus sanguinis* SK36 para evaluar la actividad inhibitoria del péptido, determinando la concentración inhibitoria media máxima (CI₅₀) para cada microorganismo. Para el cálculo de CI₅₀ se realizó un análisis de regresión logarítmica en el software Graphpad Prism 8.0.

Resultados: Se detectó la presencia de una secuencia idéntica a la bacteriocina Plantaricina-A en los genomas de *L. reuteri* disponibles en las bases de datos, determinando su peso molecular en 2,68 kDa y punto isoeléctrico de 11,06. La molécula se obtuvo purificada y cuantificada. Al exponer *L. casei* ATCC 4646 y *S. mutans* ATCC 25175 a la bacteriocina, se obtuvo una inhibición significativa del crecimiento de estos microorganismos, determinando la CI₅₀ de $0,53 \pm 0,17$ µg/ml y $1,52 \pm 1,0$ µg/ml respectivamente. Por otra parte, en *S. sanguinis* SK36 no se evidenciaron cambios estadísticamente significativos en su crecimiento.

Discusión: Analizando ambas especies de *Streptococcus* se evidenció una respuesta diferencial a la presencia de la bacteriocina, lo que supondría la existencia

de mecanismos adaptativos que podrían ser nicho-dependientes. La inhibición evidenciada en *S. mutans* ATCC 25175 y *L. casei* ATCC 4646 se condice con los estudios de actividad anticariogénica del probiótico *L. reuteri*.

Conclusión: La actividad antibacteriana de la bacteriocina de *L. reuteri* ATCC 5289 es distinta entre los microorganismos analizados, asociados a salud oral y enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Microbiota y salud oral

Durante los últimos años la investigación microbiológica ha ido actualizando conceptos fundamentales para entender la relación existente entre los microorganismos que cohabitan en el ser humano y su impacto en la salud. Uno de éstos es el término de microbiota, el cual hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado como, por ejemplo, el tracto digestivo o la cavidad oral (Sebastián-Domingo & Sánchez-Sánchez, 2018). En otras palabras, es el ensamblaje microbiano procedente de distintos dominios (*Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*) que van a estar dentro de esta comunidad bacteriana (Berg *et al.*, 2020). Por otro lado, el microbioma es el conjunto formado por los microorganismos, genes y sus metabolitos, lo que incluye variados procesos genéticos involucrados en este hábitat, lo que resulta en la formación de un nicho ecológico específico (Berg *et al.*, 2020).

La cavidad oral de los seres humanos comprende un sistema de complejas interacciones y relaciones entre células propias del hospedero y microorganismos simbióticos, tales como bacterias, y hongos (Mosaddad *et al.*, 2019). Se ha considerado que posee la segunda comunidad microbiana más compleja después del colon (Wade, 2013).

El desarrollo y avance de nuevas técnicas moleculares y biotecnológicas han permitido un mejor entendimiento de la composición y efecto de la microbiota oral, tanto en salud como enfermedad (Jiang *et al.*, 2019), por lo que se ha vuelto un formidable blanco de estudio e investigación. Se ha determinado una gran variedad de microorganismos presentes en ella, estimando un mínimo de 700 especies distintas; con distintas ubicaciones como saliva, tejido blando (mucosa y lengua) y tejido duro (dientes, prótesis e implantes) (Arweiler & Netuschil, 2016; Zhang *et al.*, 2018). La conformación de este nicho cambia a lo largo de la vida del individuo, comenzando con una colonización inicial durante el nacimiento, avanzando hacia una composición diferente y estable en la vejez (Jiang *et al.*, 2019; Krishnan *et al.*, 2017).

Esta comunidad bacteriana posee una importante asociación a la salud oral y sistémica del ser humano, pues comprende una función protectora ante la colonización de microorganismos exógenos que pudiesen afectar la salud (Arweiler & Netuschil, 2016; Wade, 2013). Se ha descrito que algunos miembros de los géneros *Streptococcus*, *Eikenella*, *Granulicatella*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Treponema*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Gamella*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium* se presentan con mayor incidencia en cavidades orales sanas (Mosaddad *et al.*, 2019). Dentro del género *Streptococcus* se ha estudiado a la especie *Streptococcus sanguinis*, considerado como un microorganismo comensal asociado a la formación temprana de biopelículas orales en personas libres de lesiones de caries; en donde sus mecanismos de competencia inhiben la colonización de bacterias asociadas a enfermedad de caries como *Streptococcus mutans* (Kreth *et al.*, 2017; Lozano *et al.*, 2019).

2.2. Microbiota y caries dental

La enfermedad de caries corresponde a una patología multifactorial, no transmisible y dinámica; mediada por una biopelícula microbiana o *biofilm* (conjunto de microorganismos adheridos a la superficie dental, inmersos en una matriz polimérica extracelular) y modulada por la dieta, que da lugar a una pérdida mineral neta de los tejidos dentales duros. Está determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. Como consecuencia de este proceso se desarrolla una lesión de caries, signo clínico de esta enfermedad (MacHiulskiene *et al.*, 2020; Pitts *et al.*, 2017).

La caries dental abarca una serie de interacciones entre la estructura dentaria, la microbiota correspondiente a la biopelícula formada en la superficie dental y la disponibilidad de azúcares fermentables, así como también a factores del hospedero. Esto se traduce en un constante equilibrio entre procesos de desmineralización y remineralización hasta el punto en que, si la desmineralización neta ocurre por un periodo prolongado y a mayor nivel que el proceso inverso, se da el inicio a una lesión de caries en un sitio específico de la estructura dentaria (Pitts *et al.*, 2017).

Esta modulación del equilibrio en la dinámica de la enfermedad se explica por causas multifactoriales, en donde un elemento fundamental a considerar es la organización estructural y funcional de la microbiota. Una alteración del ambiente va a generar un cambio en la composición relativa de los microorganismos comensales de la comunidad bacteriana, llevándola a un estado en donde predominan especies acidúricas y patobiontes (Wade, 2013). Este proceso se conoce como disbiosis, en donde los patobiontes se definen como microorganismos endógenos benignos que tienen la capacidad, en condiciones de un ecosistema alterado, de provocar determinadas patologías (Sebastián-Domingo & Sánchez-Sánchez, 2018).

Diversos estudios han determinado que *Streptococcus mutans*, y miembros de los géneros *Lactocaseibacillus*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Veillonella* y *Scardovia* se encuentran asociados a lesiones de caries; principalmente en población infantil, adolescente y adulta (Jiang *et al.*, 2019). Si bien originalmente se consideró a *Streptococcus mutans* como la especie mayormente relacionada a caries dental (Kaur *et al.*, 2013; Tanner *et al.*, 2011), estudios recientes indican que la relación entre este microorganismo y la enfermedad no es absoluta, pues se le ha detectado en grandes proporciones sobre superficies dentarias sin desarrollo de lesión de caries, o que la lesión puede desarrollarse en sitios en ausencia de *Streptococcus mutans* (Chen & Jiang, 2014). Numerosos estudios han identificado a *Lactocaseibacillus casei* como una de las especies predominantes en tejidos de lesiones de caries, estando presente en las distintas capas dentinarias de lesiones cariosas de adolescentes, siendo incluso muy prevalentes en las capas profundas (Riquelme, 2018; Wolff *et al.*, 2013).

2.3. Probióticos en caries dental

Hasta el día de hoy la caries dental se ha mantenido como una de las enfermedades con mayor prevalencia en las personas a nivel mundial, afectando al 34,1% de la población total, con mayor incidencia en países no desarrollados o en vías de desarrollo (Peres *et al.*, 2019). A nivel local, la prevalencia de caries en Chile es de 17,5% a los 2 años, 49,6% a los 4 años, 70,4% a los 6 años, 62,5% a los 12 años y de un 99,4% en la población adulta de 65 a 74 años, constituyendo un permanente

problema de salud pública en el país (MINSAL, 2017). Esto se debe principalmente a que la enfermedad de caries no puede ser combatida como una patología clásica de carácter infeccioso. Si bien todas las especies asociadas a lesiones de caries comparten un fenotipo acidogénico y acidúrico, no existen microorganismos particulares que determinen el diagnóstico de esta enfermedad (Twetman, 2018).

Debido a lo anterior se ha determinado que el manejo fundamental de esta patología recae en el enfoque preventivo. Se han empleado distintas estrategias a lo largo de los años, como el uso de flúor en las pastas dentales y la fluoración del agua potable; en conjunto con la aplicación de sellantes en fosas y fisuras de los dientes. Sin embargo, estas medidas no han demostrado ser lo suficientemente eficaces en el largo plazo (Cannon *et al.*, 2019).

En las últimas dos décadas la investigación se ha dedicado a evaluar el rol de los microorganismos probióticos como una opción de estrategia preventiva para la caries dental (Seminario-Amez *et al.*, 2017). Consensos internacionales de expertos han revisado y actualizado constantemente el concepto de probiótico, definiéndolo hoy en día como “miembro(s) de una especie segura, en donde hay evidencia suficiente de un efecto benéfico general en humanos; o microorganismos con una propiedad (estructural, una actividad o subproducto) para el cual existe suficiente evidencia de un efecto beneficioso general en humanos” (Hill *et al.*, 2014; Sanders, 2008). La investigación asociada a este tipo de microorganismos ha demostrado su efecto benéfico como colonizadoras a nivel del tracto gastrointestinal (Bustamante *et al.*, 2020; Mahasneh & Mahasneh, 2017). El fundamento detrás del uso de cepas probióticas en la terapia preventiva es, en términos simples, poder modular o reemplazar microorganismos no deseados con la ayuda de bacterias comensales o que no generen mayor daño a la salud del individuo, sin necesidad del uso de antibióticos o agentes antimicrobianos (Twetman *et al.*, 2017).

El efecto de los probióticos en la enfermedad de caries y en sus factores de riesgo relacionados se han evaluado en diversos estudios clínicos, examinando principalmente las especies *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* CD2 y *Bifidobacterium* spp. (Cagetti *et al.*, 2013). Se ha analizado su efecto

en la reducción de la incidencia de lesiones de caries, recuento de *Streptococcus mutans* y otras bacterias acidolácticas, y control del pH en la biopelícula (Mu *et al.*, 2018). Así mismo, estudios clínicos realizados en Chile han demostrado que el probiótico *L. rhamnosus* SP1 administrado en formato tópico/sistémico tiene un efecto benéfico/protector frente a los fenómenos de desmineralización de la caries dental (Seguel, 2020); y que la ingesta regular durante 10 meses de leche suplementada con probiótico *L. rhamnosus* SP1 reduce la prevalencia de caries e incidencia de nuevos dientes con lesiones de caries tanto cavitadas como no cavitadas en prescolares (Rodríguez *et al.*, 2016; Sandoval *et al.*, 2021).

Dentro de los mecanismos de acción que presentan los probióticos a nivel general, la literatura describe algunos en común: competencia por el nicho con otros microorganismos, antagonismo con especies asociadas a enfermedad, modulación de la respuesta inmune del hospedero e interacción con el epitelio oral (Twetman, 2018). A nivel más específico, se ha descrito que son capaces de impedir el crecimiento de bacterias a través de la producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos (Bustamante *et al.*, 2020; Hasslöf & Stecksén-Blicks, 2019; Mahasneh & Mahasneh, 2017). Los microorganismos presentes en la biopelícula oral interactúan tanto sinérgica como antagónicamente, en donde las interacciones sinérgicas involucran complementación enzimática, co-adhesión, formación de redes de nutrientes, señalización molecular y transferencia de genes; mientras que las interacciones antagónicas incluyen producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos, además de liberación de fagos y competencia por los nutrientes del medio (Marsh & Zaura, 2017).

Es importante, sin embargo, enfatizar que los mecanismos de acción de los probióticos siguen siendo controversiales y debatidos hoy en día, pues varios de éstos han sido descritos en condiciones experimentales ideales *in vitro*, sin lograr un entendimiento completo de las interacciones complejas que existen en el entorno oral humano (Gruner *et al.*, 2016; Hasslöf & Stecksén-Blicks, 2019). Además, existen informes contradictorios sobre los efectos inducidos por los probióticos en la respuesta del hospedero en el entorno oral (Twetman *et al.*, 2017); reportándose por un lado la nula modulación de inmunoglobulinas salivales y mediadores

inflamatorios posterior a la ingesta del probiótico *L. reuteri* (Jørgensen *et al.*, 2016), mientras que otras investigaciones reportaron un aumento en los niveles de inmunoglobulina-A y péptido neutrófilo humano (HNP) 1-3 en saliva inmediatamente después de la exposición al probiótico (Ericson *et al.*, 2013; Wattanarat *et al.*, 2015).

2.4. *Limosilactobacillus reuteri*

Dentro de los microorganismos probióticos más estudiados en relación con caries dental se encuentra *Limosilactobacillus reuteri*, descrito por primera vez en 1962 por Kandler *et al.* como *Lactobacillus reuteri*, una especie capaz de crecer en ambientes anaeróbicos y de colonizar el tracto gastrointestinal de humanos y animales (Kandler *et al.*, 1980). Gracias a los avances en las herramientas de secuenciación de ADN y genoma, en abril de 2020 se estableció un nuevo consenso taxonómico del género *Lactobacillus*, definiendo 25 nuevos géneros, en donde 23 especies nobles se reclasificaron en su género como *Limosilactobacillus*, debido a la propiedad de la mayoría de ellas de producir exopolisacáridos a partir de sacarosa (adj. *limosus*); describiendo a esta especie finalmente como *Limosilactobacillus reuteri* (Zheng *et al.*, 2020).

Esta especie se ha considerado un microorganismo endógeno auténtico del ser humano, pues durante y brevemente después del nacimiento las superficies epiteliales de la cavidad oral son colonizadas por estas bacterias provenientes de la lactancia materna y tienden a persistir en la boca, lo que puede suponer un rol en la competencia por el nicho con otras bacterias que colonizan en etapas tardías (Sinkiewicz, 2010).

Se ha realizado una numerosa cantidad de estudios y ensayos clínicos en relación con los beneficios que genera este probiótico en la salud general del individuo, mejorando las defensas contra enfermedades a nivel gastrointestinal, síntomas cólicos en bebés lactantes, reducción de infecciones y mayor tolerancia en la alimentación suplementaria a recién nacidos (Savino *et al.*, 2015; Sung *et al.*, 2018). A nivel oral también se han evaluado los beneficios del uso de este probiótico, exhibiendo un gran aumento de investigación clínica en los últimos años. Se ha reportado efectos benéficos asociados a gingivitis en embarazadas, periodontitis

crónica, infecciones oportunistas asociadas a *Candida* spp., halitosis y caries dental (Keller *et al.*, 2012; Stensson *et al.*, 2014; Vicario *et al.*, 2013). Respecto a esto último, la literatura ha reportado que esta especie es capaz de modular la actividad metabólica e inhibición del crecimiento, formación de biopelículas y expresión génica de *Streptococcus mutans* en ensayos experimentales *in vitro* (Kang *et al.*, 2011; Nikawa *et al.*, 2004; Wasfi *et al.*, 2018).

Estas investigaciones se han enfocado principalmente en la cepa *L. reuteri* ATCC 5289 (Biogaia®, Suecia), especie aislada de la cavidad oral de una mujer japonesa con buena salud dental (Spinler *et al.*, 2008). Se ha reportado que esta cepa presenta mejores propiedades de adhesión y formación de biopelículas en superficies dentales en comparación con *L. reuteri* ATCC 55730 (Jalasvuori *et al.*, 2012). Estudios clínicos han analizado que el consumo de esta cepa probiótica por un período de 12 semanas es capaz de inducir un cambio en la composición de la microbiota sin afectar la diversidad total de las especies (Vestman *et al.*, 2015).

También se ha reportado que la administración en tabletas de *L. reuteri* ATCC 5289 produce una disminución significativa de la respuesta proinflamatoria mediada por citoquinas y una mejora de los parámetros clínicos en pacientes con periodontitis (Szkaradkiewicz *et al.*, 2014). En Chile se realizó un estudio clínico el año 2018 en donde se evaluó los efectos clínicos de *L. reuteri* ATCC 5289 en el tratamiento de la gingivitis, evidenciando que su uso en forma de tabletas como terapia adjunta produce una reducción significativa en el número de sitios con inflamación más severa (Bravo *et al.*, 2018).

El mecanismo de acción de *L. reuteri* que permite esta modulación y efectos inhibitorios aún no se encuentra completamente esclarecido y entendido en su totalidad, al ser una serie de procesos que tienen acción en conjunto. Se ha propuesto que esta bacteria es capaz de producir factores antimicrobianos y antiinflamatorios como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, factores inhibidores de la adhesión y que favorecen la competencia por el nicho con otras bacterias (Gobbi *et al.*, 2020; Jones & Versalovic, 2009; Yu *et al.*, 2020).

2.5. Bacteriocinas

Éstas corresponden a proteínas o péptidos antimicrobianos (PAMs) sintetizadas por un gran y variado número de microorganismos, reportadas por primera vez en 1925 en *Escherichia coli* y estudiadas desde entonces (Negash & Tsehai, 2020). Abarcan una familia heterogénea de moléculas sintetizadas en el ribosoma con una fuerte actividad antimicrobiana a concentraciones determinadas, con un espectro de actividad dirigido principalmente a bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora; aunque se ha visto también que pueden tener actividad en grupos de bacterias no relacionadas (Soltani *et al.*, 2021).

Actualmente existen distintos sistemas de clasificación para las bacteriocinas, los cuales se basan en la secuencia y composición aminoacídica de éstas o en sus propiedades bioquímicas (Ahmad *et al.*, 2017; Soltani *et al.*, 2021). Soltani *et al.* proponen en el año 2021 una clasificación en tres grandes clases de bacteriocinas: las clase I o lantibióticas, descritas como péptidos de tamaño <10 kDa modificados a nivel postraducciona y resistentes a temperaturas altas; bacteriocinas clase II, las cuales no se encuentran modificadas (también llamadas no lantibióticas), resistentes a temperaturas altas y de tamaño <10 kDa; y bacteriocinas clase III, descritas como lábiles a altas temperaturas y de peso molecular mayor a 30 kDa. Así mismo, existen 3 subdivisiones de la clase II: clase IIa, en donde las bacteriocinas presentan la secuencia canónica INGV; la clase IIb, las cuales requieren estructuralmente de dos péptidos para su actividad antibacteriana; y la clase IIc, bacteriocinas de un solo péptido, resistentes a altas temperaturas y que no presentan la secuencia canónica YGNGV (Soltani *et al.*, 2021).

Estas moléculas han sido blanco de interés en el campo de las ciencias biomédicas debido a su propiedad principal de ser un inhibidor potencial de varios microorganismos asociados a enfermedades; presentar una naturaleza no tóxica y demostrar actividad frente a bacterias resistentes a antibióticos (Ahmad *et al.*, 2017). En relación a la cavidad oral, la literatura reporta estudios *in vitro* los cuales describen una potencial actividad antimicrobiana de distintas bacteriocinas sobre microorganismos asociados a patologías orales como enfermedad periodontal y enfermedad de caries (Negash & Tsehai, 2020).

En 1991, Toba *et al.* describieron una bacteriocina producida por *L. reuteri*, llamándola reutericina 6, y Kabuki *et al.* en 1997 reportaron su purificación y caracterización, analizando también su actividad lítica (Kabuki *et al.*, 1997; Toba *et al.*, 1991). Existe otro estudio de 2001 en donde se determina que *L. reuteri* y *L. gasseri* producen una bacteriocina cíclica idéntica (denominadas reutericina 6 y gassericina A, respectivamente), analizando por primera vez su secuencia nucleotídica y aminoacídica (Kawai *et al.*, 2001). Sin embargo, la secuencia reportada de reutericina 6 no se encuentra registrada en las bases de datos genómicas de *L. reuteri*, y hasta la fecha no se han realizado más investigaciones al respecto. Por otra parte, en estudios preliminares en el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, se analizaron las secuencias de los genomas de las 212 cepas de *L. reuteri* publicadas en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), sin encontrar genes ortólogos a la secuencia publicada de reutericina 6/gassericina A señalada anteriormente (datos no publicados).

Considerando todos los antecedentes presentados sobre la investigación y efectividad de *L. reuteri* como probiótico oral, y el hecho de que no se ha definido de manera precisa el mecanismo de acción molecular de su actividad, es que en este trabajo se propuso realizar el aislamiento, purificación y caracterización bioquímica de bacteriocina(s) de *L. reuteri* ATCC 5289 para posteriormente evaluar su actividad antibacteriana sobre microorganismos asociados a salud (como *S. sanguinis* SK36) y a enfermedad de caries (como *S. mutans* ATCC 25175 y *L. casei* ATCC 4646).

3. HIPÓTESIS

Limosilactobacillus reuteri ATCC 5289 produce una o más bacteriocinas, la(s) cual(es) inhibe(n) selectivamente el crecimiento de bacterias asociadas a enfermedad de caries, sin afectar bacterias comensales asociadas a salud oral.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia y caracterizar una bacteriocina producida por *L. reuteri* ATCC 5289, determinando su actividad antibacteriana sobre microorganismos asociados a salud oral y enfermedad de caries.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de bacteriocina(s) en los genomas de *L. reuteri* disponibles en las bases de datos y caracterizarla(s) *in silico*.
2. Determinar la presencia de bacteriocina(s) en cultivos de *L. reuteri* ATCC 5289 y realizar la purificación de ésta(s).
3. Analizar el efecto de una bacteriocina de *L. reuteri* ATCC 5289 sobre el crecimiento de los microorganismos asociados a salud (*S. sanguinis* SK36) y a enfermedad de caries (*L. casei* ATCC 4646 y *S. mutans* ATCC 25175).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se encuentra asociado al proyecto PRIODO 2021/14. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) de Campus Norte, Universidad de Chile. El trabajo corresponde a un estudio de tipo experimental (analítico y prospectivo).

6.1. Análisis *in silico* de los genomas disponibles de *L. reuteri*

Se analizó la secuencia genómica de 212 cepas de *L. reuteri*, disponibles en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), a través del programa de alineamiento de secuencias BLAST, disponible en la misma plataforma. Se comparó y alineó con 137 secuencias aminoacídicas pertenecientes a bacteriocinas previamente descritas y caracterizadas, obtenidas de la base de datos BactiBase (<http://bactibase.hamamilab.org/>), y se determinó *in silico* la presencia de alguna de estas secuencias en los genomas de *L. reuteri* (Hammami *et al.*, 2007).

6.2. Caracterización *in silico* de la(s) bacteriocina(s)

Se obtuvieron los parámetros de peso molecular, punto isoeléctrico y composición aminoacídica de una secuencia de bacteriocina encontrada, a través del programa EMBOSS Pepstats (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/) (Madeira *et al.*, 2022). Estos análisis permitieron establecer una clasificación preliminar de la bacteriocina en base a las características estructurales predichas.

6.3. Cepas bacterianas y cultivos microbiológicos

Limosilactobacillus reuteri: se utilizó la cepa ATCC 5289 y se cultivó en placas de medio de cultivo selectivo para el crecimiento de bacterias de la familia *Lactobacillaceae* llamado Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Oxoid®) a 37°C en 5% de CO₂ por 24 h; y en cultivo líquido igualmente de medio MRS durante 16 h.

Lactocaseibacillus casei: se cultivó la cepa ATCC 4646 en placas de medio de cultivo selectivo MRS para el crecimiento de bacterias de la familia *Lactobacillaceae*, a 37°C en 5% de CO₂ por 24 h; y en cultivo líquido igualmente de medio MRS durante 16 h.

Streptococcus mutans: se cultivó la cepa ATCC 25175, en medio de cultivo agar *Brain Heart Infusion* (BHI, BD®), a 37°C en 5% de CO₂ por 24 h; y cultivo líquido igualmente en medio BHI durante 16 h.

Streptococcus sanguinis: se cultivó la cepa SK36, en medio de cultivo agar BHI, a 37°C en 5% de CO₂, 24 h; y cultivo líquido igualmente en medio BHI durante 16 h.

Todas las cepas utilizadas en este estudio fueron sembradas, en placas del medio-agar respectivo, a través de estrías por agotamiento, obteniendo el aislamiento por diseminación y permitiendo la obtención de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) aisladas. Estas U.F.C. fueron observadas mediante lupa estereoscópica (Carl Zeiss, aumento 10X), para comprobar sus características morfológicas. Sumado a esto y de manera previa en el laboratorio, se comprobó mediante PCR la identidad de cada una de las especies.

Para estandarizar todas las muestras, se controló el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un lector de placas Synergy System (Biotek®), ajustándola a un valor de 0,5.

6.4. Purificación y cuantificación de bacteriocina(s) por RP-HPLC

El procedimiento para obtener el sobrenadante de los cultivos líquidos de *L. reuteri* ATCC 5289, se llevó a cabo como describió Zhang *et al.* (2018). Se inoculó *L. reuteri* ATCC 5289 en 1 litro de medio líquido MRS y se incubó a 37 °C por 16 h. Posteriormente se centrifugó a 8.000 *g* durante 10 min a 4°C y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore Merck®) para obtener el sobrenadante libre de células (SLC). El SLC fue tratado con sulfato de amonio al 80% m/v de concentración final con el fin de producir la precipitación de la(s) bacteriocina(s). Se agitó orbitalmente durante 12 h a 4°C; y el precipitado se separó mediante centrifugación a 10.000 *g* por 20 min, y fue solubilizado en agua bidestilada. Este preparado se dializó utilizando una membrana de 1000 Dalton (Sigma®), tal como se describe en la literatura (Zhang *et al.*, 2018). La muestra fue enviada al laboratorio de Bioquímica del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) en donde se realizó cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (RP-HPLC). Se utilizó una columna analítica con un flujo de 0,5 ml/min y un gradiente entre 0-100% de acetonitrilo

(Merck®). Las muestras fueron detectadas por absorciometría a 220 nm. La fracción activa fue recolectada del eluido de la columna y fue cuantificada mediante el ensayo *Bio-Rad Protein assay kit*, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Finalmente, la muestra fue almacenada en una solución tampón (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 10% glicerol, pH 7,4) para su posterior uso en los demás ensayos.

6.5. Análisis del efecto de la bacteriocina en el crecimiento de distintos microorganismos

El análisis del efecto de la bacteriocina en el crecimiento de los microorganismos orales, se realizó como lo describe Sánchez (2020), con ciertas modificaciones. Las cepas *S. mutans* ATCC 25175 y *S. sanguinis* ATCC 4646 fueron inoculadas en 5 ml de medio BHI mientras que *L. casei* fue inoculada en 5 ml de medio MRS, y posteriormente incubadas 16 h a 37°C en 5% de CO₂. Los cultivos fueron centrifugados a 6000 g por 5 min a 21°C y cada uno fue resuspendido en medio de cultivo BHI o MRS fresco, según corresponda, para obtener una D.O. (600nm) final de 0,5.

En conjunto con lo anterior, se realizaron diluciones seriadas dobles a partir de la bacteriocina concentrada en 54 µg/ml, obteniendo concentraciones separadas de 27; 13,5; 6,75; 3,338; 1,688 y 0,844 µg/ml respectivamente. Se agregó 20 µl de cada concentración a una placa de 96 pocillos de polipropileno, y posteriormente se agregó 20 µl del microorganismo a evaluar y 160 µl de medio de cultivo BHI o MRS según corresponda. Las muestras fueron incubadas durante 15 h a 37 °C en aerofilia en un lector de placas Synergy System (Biotek®) programado previamente para medir la D.O. a 600nm cada 30 min con el fin de registrar el crecimiento bacteriano.

Para cada microorganismo se obtuvieron las curvas de crecimiento considerando un control negativo correspondiente a medio de cultivo MRS o BHI según el microorganismo evaluado, un grupo sin la bacteriocina añadida y siete grupos con las distintas concentraciones utilizadas de la molécula.

6.6. Determinación de la concentración inhibitoria media máxima de la bacteriocina en distintos microorganismos

La concentración inhibitoria media máxima (CI₅₀) se determinó a partir de las curvas obtenidas mediante el método de microdilución en caldo descrito por Goh & Philip (2015). La CI₅₀ se consideró como la concentración más baja de la bacteriocina que inhibe el crecimiento bacteriano en un 50%. Para el cálculo de la CI₅₀ se realizó un análisis de regresión logarítmica en el software Graphpad Prism 8.0, obteniendo una curva de tipo concentración-respuesta.

6.7. Análisis estadísticos

Todos los ensayos *in vitro* se realizaron en triplicado, en 3 réplicas biológicas independientes (salvo la determinación de la CI₅₀ en *S. mutans* ATCC 25175 donde solo se pudo evaluar dos ensayos independientes), y se presentaron los promedios de los resultados con sus respectivas desviaciones estándar. Se evaluó la normalidad de los datos obtenidos a través de la prueba de Shapiro-Wilk. Al no existir una distribución normal de los datos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar la significancia estadística (definida como $p < 0,05$).

7. RESULTADOS

7.1. Análisis *in silico* sobre la presencia de bacteriocina(s) en el genoma de *L. reuteri*

Con la finalidad de determinar la presencia de secuencias asociadas a bacteriocinas, se realizó un análisis *in silico*. La tabla 1 detalla una fracción de los resultados de la búsqueda y comparación de secuencias aminoacídicas correspondientes a las 137 bacteriocinas de la base de datos BactiBase en contraste con los 212 genomas de *L. reuteri* disponibles en la base de datos. Mediante este análisis se encontró que la secuencia de aminoácidos de Plantaricina-A, bacteriocina producida por *L. plantarum*, presenta un 100% de identidad con un péptido codificado en los genomas de las cepas de *L. reuteri*. El resultado completo de la búsqueda se puede observar en el anexo 1. Estos resultados permiten predecir bioinformáticamente la presencia de un gen codificando para una bacteriocina en los genomas disponibles de *L. reuteri*.

Tabla 1. Extracto de la tabla comparativa entre las secuencias aminoacídicas de bacteriocinas de la base de datos Bactibase y el alineamiento con los genomas de *L. reuteri* a través del software BLASTp.

Nombre de la bacteriocina	Clasificación	Especie productora según BactiBase	Secuencia de aminoácidos	% de similitud en <i>L. reuteri</i>	Descripción en BLASTp
Plantaricina-A	lIc	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	AYSLQMGAT AIKQVKKLFLK KWW	100	<i>bacteriocin</i>

7.2. Caracterización *in silico* de la bacteriocina

A través del programa bioinformático EMBOSS Pepstats se establecieron los parámetros estructurales y fisicoquímicos de la secuencia de Plantaricina-A encontrada en los genomas de *L. reuteri* analizados. La tabla 2 muestra una parte de los resultados obtenidos en este análisis. Estos resultados permitieron establecer las características de peso molecular y punto isoeléctrico preliminares, como referencia para los ensayos de laboratorio. El detalle completo del análisis a través de esta herramienta se puede observar en el anexo 2.

Tabla 2. Características bioquímicas predichas para la bacteriocina, determinadas a través del programa EMBOSS Pepstats.

Secuencia de aminoácidos	Número de residuos	Peso molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico	Carga neta a pH 7,0
AYSLQMGAT AIKQVKKLFK KWGW	23	2,68	11,016	+5

7.3. Obtención de la bacteriocina por RP-HPLC

La figura 1 muestra los perfiles cromatográficos obtenidos durante el proceso de purificación de un péptido de peso molecular correspondiente al predicho de 2,68 kDa para la bacteriocina. La figura 1.a muestra el cromatograma obtenido a partir del sobrenadante de *L. reuteri* procesado como se describe en la sección 6.4, donde se observa un *peak* con un tiempo de retención de 25,39 min; tiempo similar al mostrado por un péptido estándar de 2,7 kDa, cuyo tiempo de retención fue de 25,44 min (figura 1.b). En la figura 1.c se muestra la fracción purificada, la cual presentó un tiempo de retención de 25,24 min, obteniéndose 72 µg totales a una concentración de 18 µg/ml.

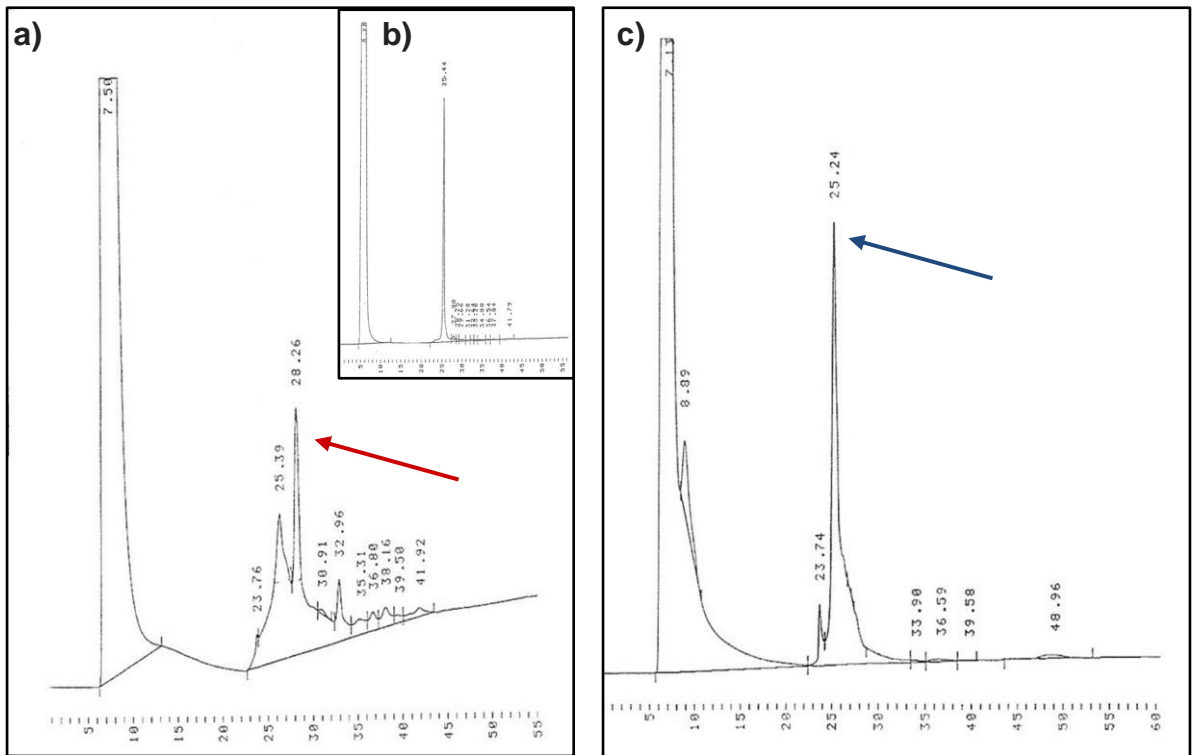
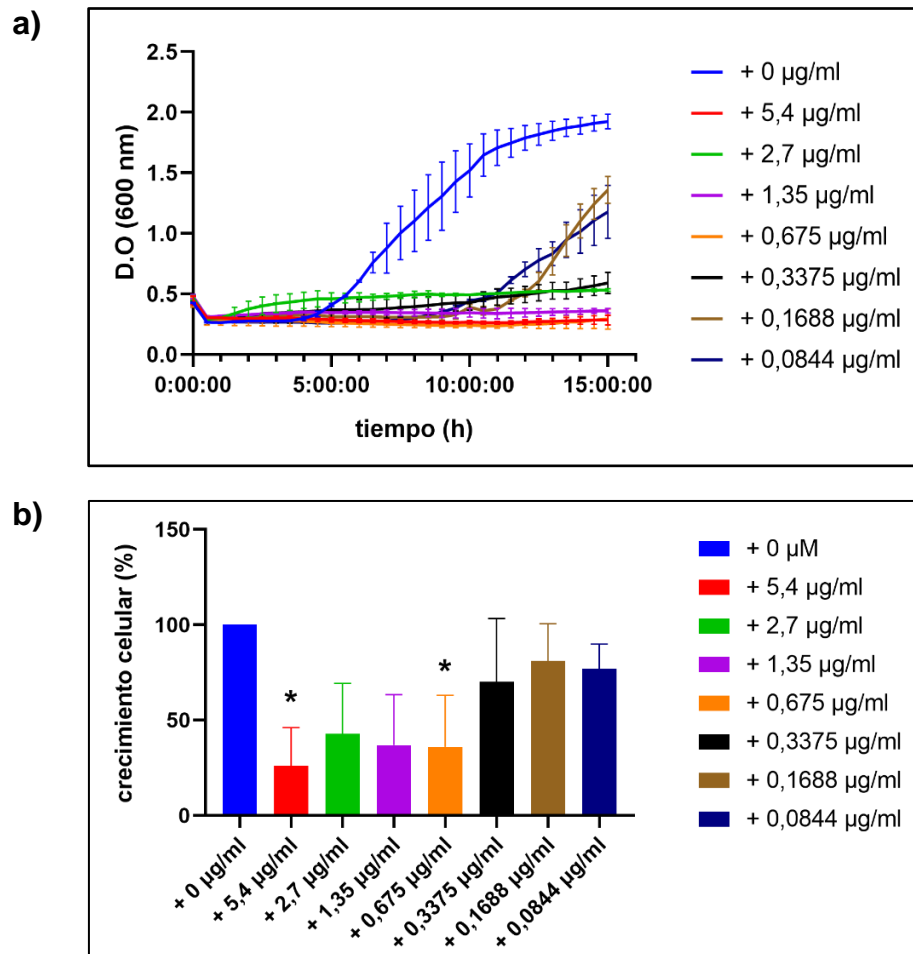


Figura 1. Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC. a) Perfil cromatográfico del sobrenadante de *L. reuteri* ATCC 5289. El *peak* señalado en rojo corresponde a la fracción con el mismo peso molecular que el péptido estándar. **b)** Perfil cromatográfico del péptido estándar. **c)** Perfil cromatográfico de la fracción purificada. El *peak* señalado en azul corresponde a la fracción eluida con un 99,8% de pureza.

7.4. Efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de *L. casei* ATCC 4646

En la figura 2.a se observa la curva de crecimiento de *L. casei* ATCC 4646. Se puede apreciar que el crecimiento fue menor en todas las muestras en donde se adicionó la bacteriocina en comparación al grupo en donde no se añadió la molécula, principalmente a partir de la concentración 0,3375 µg/ml. Así mismo, se observó que los resultados del crecimiento final a las 15 horas (figura 2.b) presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo sin bacteriocina añadida y las concentraciones de 5,4 y 0,675 µg/ml de la bacteriocina, ocurriendo un efecto inhibitorio de la molécula sobre el crecimiento de *L. casei* ATCC 4646.



7.5. Efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175

Al analizar el efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175 (figura 3.a) se puede observar una tendencia a la disminución del crecimiento a medida que aumenta la concentración de la bacteriocina en comparación con el grupo en donde no se añadió la molécula; habiendo un efecto inhibitorio estadísticamente significativo ($p < 0,05$) sólo en las concentraciones de 5,4 $\mu\text{g/ml}$ y 2,7 $\mu\text{g/ml}$, como se aprecia en el crecimiento final a las 15 h (figura 3.b).

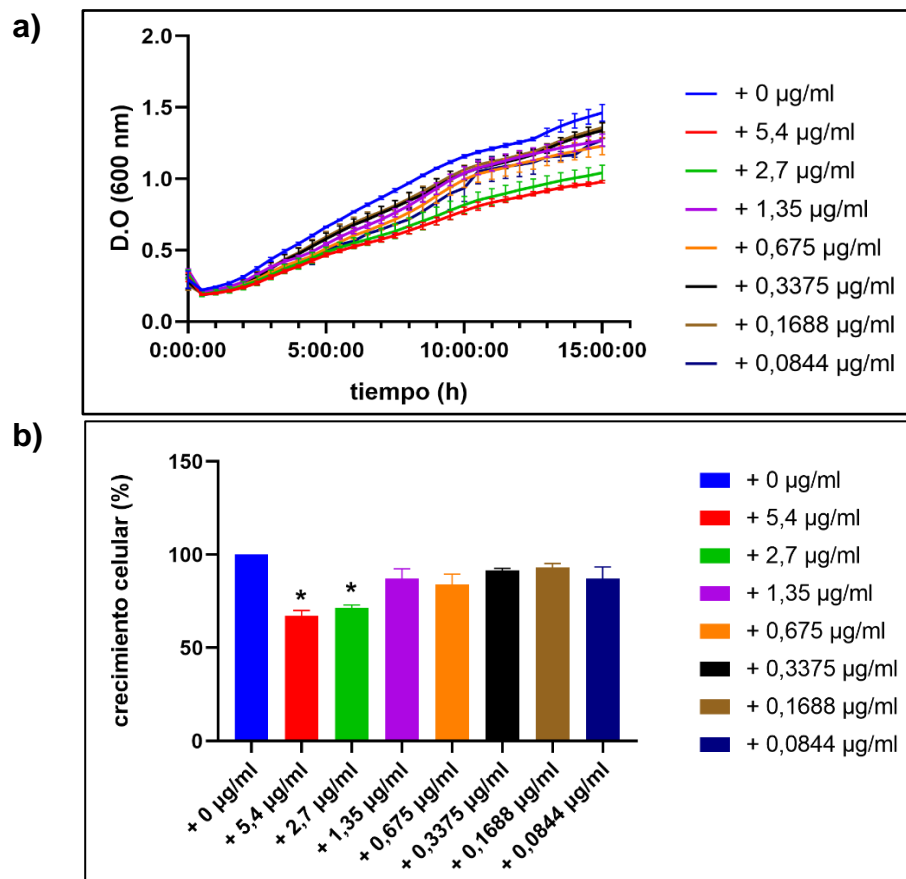


Figura 3. Efecto de la bacteriocina en el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175. a) Curvas de crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175 en presencia de diferentes concentraciones de bacteriocina, expresado como absorbancia a D.O. 600 nm con registro cada 30 minutos. b) Efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175 a las 15 horas de incubación, expresado como porcentaje con respecto al crecimiento en ausencia de bacteriocina (0 $\mu\text{g/ml}$). Existe diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de 5,4 $\mu\text{g/ml}$ y 2,7 $\mu\text{g/ml}$ comparadas al grupo sin bacteriocina añadida (prueba de Kruskal Wallis; $p=0,0019$ y $p=0,0128$ respectivamente).

7.6. Efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. sanguinis* SK36

En el análisis del efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. sanguinis* SK36 (figura 4.a) se observó que el crecimiento fue similar en todos los grupos. Al realizar el análisis estadístico sobre los resultados del crecimiento a las 15 h, se observó que no existen diferencias significativas entre cada grupo en comparación al grupo sin bacteriocina añadida (figura 4.b), por lo que se determina que no hay un efecto inhibitorio de la molécula sobre *S. sanguinis* SK36.

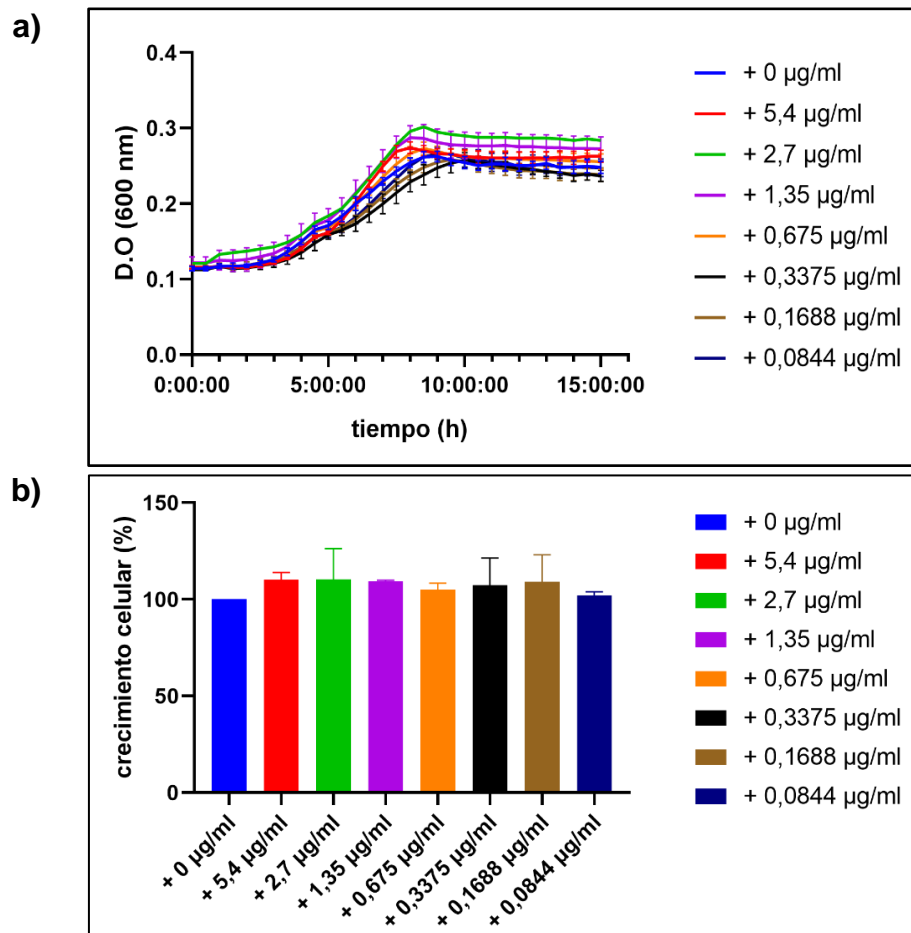


Figura 4. Efecto de la bacteriocina en el crecimiento de *S. sanguinis* SK36. a) Curvas de crecimiento de *S. sanguinis* SK36 en presencia de diferentes concentraciones de bacteriocina, expresado como absorbancia a D.O. 600 nm con registro cada 30 minutos. b) Efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. sanguinis* SK36 a las 15 h de incubación, expresado como porcentaje con respecto al crecimiento en ausencia de bacteriocina (0 µg/ml). No existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos.

7.7. Concentración inhibitoria media máxima de la bacteriocina sobre *L. casei* ATCC 4646

La figura 5 representa la relación dosis respuesta de la bacteriocina sobre el crecimiento de *L. casei* ATCC 4646. Se puede apreciar un efecto inhibitorio del crecimiento del microorganismo de tipo concentración-dependiente, el cual fue analizado a través de una regresión logarítmica no lineal en el software Graphpad Prism. Este análisis determinó que la CI_{50} fue de $0,53 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$. Los valores de los coeficientes de determinación de las tres curvas fueron mayores a 0,88.

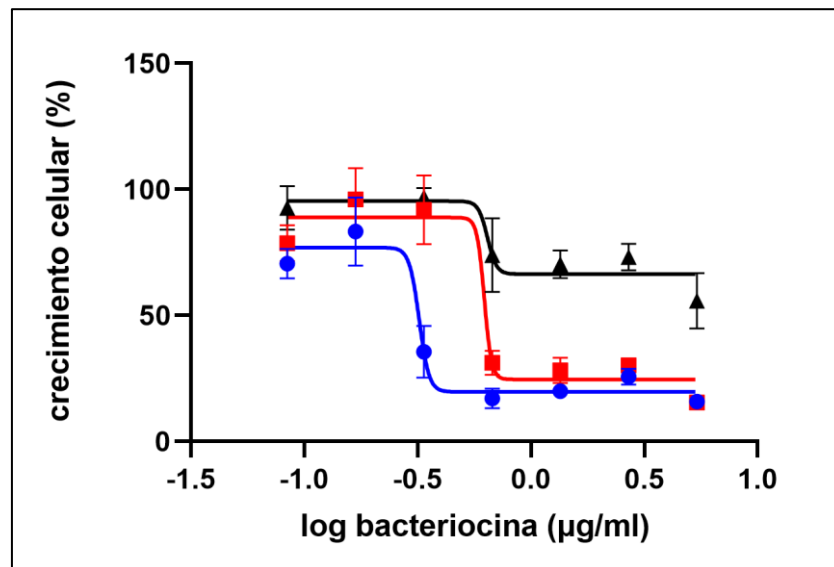


Figura 5. Curva dosis respuesta de la bacteriocina sobre el crecimiento de *L. casei* ATCC 4646.

Se muestran las curvas de tres experimentos independientes (en colores negro, rojo y azul) las cuales representan el efecto concentración-respuesta de la molécula sobre el microorganismo, medido a través del crecimiento expresado en porcentaje en función del logaritmo de la concentración de la bacteriocina. Cada ensayo se realizó por triplicado.

7.8. Concentración inhibitoria media máxima de la bacteriocina sobre *S. mutans* ATCC 25175

En el análisis de la relación dosis-respuesta de la bacteriocina sobre el crecimiento *S. mutans* ATCC 25175 se logran observar curvas con pendientes variadas (figura 6). Debido a una falla externa en la continuidad de la cadena de frío para la bacteriocina en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, no fue posible realizar nuevos ensayos para *S. mutans* ATCC 25175. El análisis estadístico determinó que la CI_{50} fue de $1,52 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$. Los valores de los coeficientes de determinación de ambas curvas fueron mayores a 0,85.

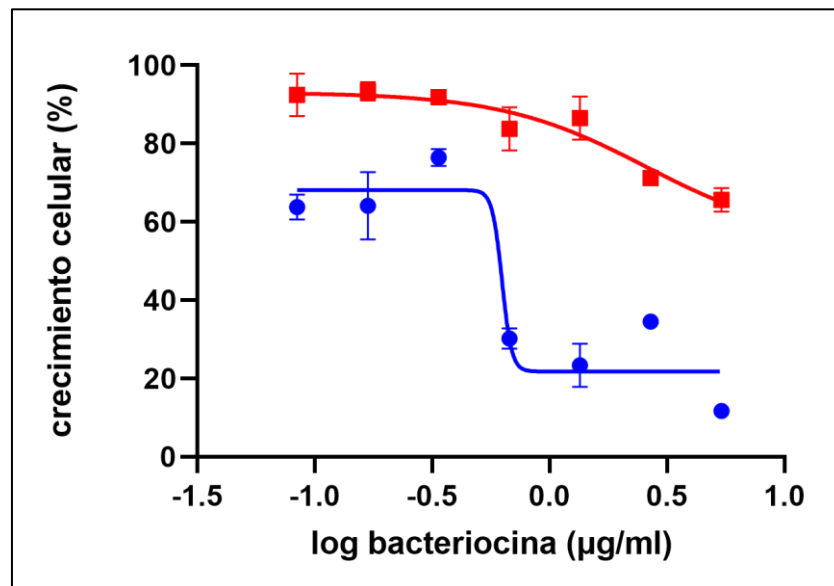


Figura 6. Curva dosis respuesta de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175. Se muestran las curvas de dos experimentos independientes (en colores rojo y azul) las cuales representan el efecto concentración-respuesta de la molécula sobre el microorganismo, medido a través del crecimiento expresado en porcentaje en función del logaritmo de la concentración de la bacteriocina. Cada ensayo se realizó por triplicado.

7.9. Concentración inhibitoria media máxima de la bacteriocina sobre *S. sanguinis* SK36

En la figura 7 se observa la relación dosis-respuesta de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. sanguinis* SK36. Se puede apreciar que en cada ensayo independiente el crecimiento es similar y constante para cada concentración de la bacteriocina utilizada. El análisis de regresión logarítmica precisó que no es posible establecer un valor para la CI_{50} , determinando que la bacteriocina no tiene efecto inhibitorio estadísticamente significativo sobre el crecimiento de *S. sanguinis* SK36.

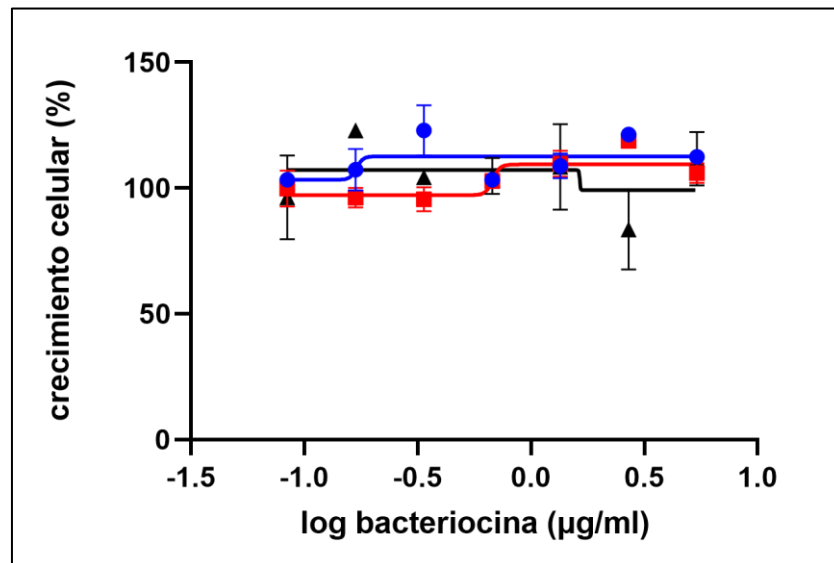


Figura 7. Curva dosis respuesta de la bacteriocina sobre el crecimiento de *S. sanguinis* SK36.

Se muestran las curvas de tres experimentos independientes (en colores negro, rojo y azul) las cuales representan el efecto concentración-respuesta de la molécula sobre el microorganismo, medido a través del crecimiento expresado en porcentaje en función del logaritmo de la concentración de la bacteriocina. Cada ensayo se realizó por triplicado.

8. DISCUSIÓN

La investigación *in silico* permite, entre otras aplicaciones, predecir a través de una simulación computacional la existencia de una molécula en el genoma de un microorganismo, analizándolo y comparando si existen secuencias aminoacídicas de otras bacteriocinas previamente registradas en distintas bases de datos (Van Heel *et al.*, 2013). El análisis realizado en este estudio permitió determinar la presencia de una secuencia aminoacídica en *L. reuteri* idéntica a una bacteriocina de *Lactiplantibacillus plantarum*, llamada Plantaricina-A. Esta molécula ha sido estudiada y descrita en la literatura como una bacteriocina de clase IIc, formada por un péptido sin modificaciones post-traduccionales (Diep *et al.*, 2009). Presenta un espectro antibacteriano relativamente estrecho, principalmente sobre otras especies de bacterias acidolácticas (Anderssen *et al.*, 1998).

La secuencia aminoacídica de la bacteriocina de *L. reuteri* fue analizada a través del software bioinformático EMBOSS Pepstats para caracterizar su naturaleza peptídica, estimando su peso molecular en 2,68 kDa y punto isoeléctrico en 11,06. Estas características, en conjunto con las propiedades descritas de Plantaricina-A, permiten hacer una clasificación de la bacteriocina encontrada. El sistema de clasificación más actualizado propone que las bacteriocinas de clase I y II presentan un peso molecular menor a 10 kDa, con la diferencia de que las primeras presentan modificaciones post-traduccionales del péptido, a diferencia de las clase II las cuales no se modifican (Ahmad *et al.*, 2017).

Dado el peso molecular predicho de 2,68 kDa de la secuencia analizada y que además no presenta la secuencia de aminoácidos INGV en su estructura, se confirma que la bacteriocina encontrada en el genoma de *L. reuteri* corresponde a clase II, de acuerdo con lo descrito para Plantaricina-A. Estos resultados se condicen con el estudio en donde se caracterizó por primera vez una bacteriocina producida por *L. reuteri* llamada reutericina 6, pues se reportó que la molécula analizada tenía un peso molecular de 2,7 kDa y que no presentaba lantionina, modificación peptídica presente en bacteriocinas clase I (Kabuki *et al.*, 1997). Sin embargo, se requiere de más análisis sobre la estructura y conformación espacial del péptido para saber si pertenece a la clase IIb o IIc.

Es importante aclarar que hasta el día de hoy no existen estudios publicados que hayan realizado una aproximación bioinformática de búsqueda de una bacteriocina en el genoma de *L. reuteri*. Más aún, los primeros estudios que se realizaron sobre la producción de reutericina 6 y su caracterización carecen de la secuencia del péptido en sus resultados (Kabuki *et al.*, 1997; Toba *et al.*, 1991). Un estudio realizado por Kawai *et al.* en el año 2001 describen la presencia de una bacteriocina en *L. reuteri* LA6, que sería idéntica a la Gassericina A reportada en *Lactobacillus gasseri* LA39. Los autores señalan que este péptido correspondería al reportado anteriormente como reutericina 6, sin embargo, el peso molecular descrito para la molécula es mucho mayor, y, hasta la fecha, la secuencia del péptido que ellos aislaron no ha sido registrada en ninguna base de datos. Por otra parte, en el análisis realizado en este estudio no se encontraron secuencias similares a Gassericina A en los genomas de *L. reuteri* (Tabla 3, Anexo 1).

Con el fin de comparar y discutir los hallazgos *in silico* de este trabajo, se volvió a analizar la secuencia genómica de *L. reuteri* en el software BAGEL 4, herramienta bioinformática dedicada exclusivamente al análisis de datos de secuencias aminoacídicas de bacteriocinas y péptidos sintetizados ribosomalmente (RiPPs); la que además cuenta con una base de datos en donde está incorporada BactiBase (utilizada en este estudio) y el programa BLAST (Van Heel *et al.*, 2018). El análisis realizado con este nuevo software encontró en el genoma de *L. reuteri* una secuencia idéntica a una bacteriocina correspondiente a Enterolisina A, un péptido con actividad antibacteriana reportada sobre bacterias del género *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*; y que está clasificada como una bacteriocina de clase III, pues presenta un peso molecular de 34,5 kDa y es susceptible a altas temperaturas (Nilsen *et al.*, 2003). Estas características determinan que el péptido encontrado en esta investigación no corresponde a Enterolisina A, lo que indicaría que *L. reuteri* podría ser capaz de producir más de una bacteriocina. Es importante recalcar que en este estudio se trabajó exclusivamente con un péptido de un peso molecular determinado de 2,7 kDa con un 99,8% de pureza, lo que garantiza que los efectos obtenidos son exclusivos del péptido encontrado.

Señalado todo lo anterior, se debe enfatizar que un análisis bioinformático no es suficiente para determinar completamente la estructura y propiedades de la molécula investigada. Es pertinente realizar ensayos que evalúen sus propiedades *in vitro*, así como su funcionalidad y las condiciones celulares de su expresión.

Hasta la fecha no se han reportado investigaciones sobre el efecto particular de bacteriocinas de *L. reuteri* sobre el crecimiento de otros microorganismos, tal y como se realizó en el presente estudio, ya que los estudios publicados se han enfocado principalmente en estudiar a los probióticos evaluando, por ejemplo, la actividad del sobrenadante completo de sus cultivos (Jones & Versalovic, 2009; Stensson *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2020). No obstante, resulta pertinente hacer comparaciones del efecto de esta bacteriocina con la investigación que se ha realizado sobre Plantaricina-A, puesto que teóricamente corresponden a secuencias aminoacídicas idénticas y por ende a la misma molécula.

En relación con el efecto de la bacteriocina sobre la especie *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646, los resultados indican que existe un efecto inhibitorio estadísticamente significativo en el crecimiento del microorganismo, determinando una CI_{50} de $0,53 \pm 0,17$ $\mu\text{g/ml}$. Se puede observar también que en todas las curvas de crecimiento realizadas en presencia de bacteriocina hubo inhibición, la cual aumentó en relación con la concentración de la bacteriocina. Este resultado es comparable con el estudio realizado por Anderssen *et al.* (1998), en donde se evaluó la actividad antibacteriana de Plantaricina-A sobre *L. casei* y otras especies acidolácticas, reportando un efecto inhibitorio significativo. Se ha propuesto que esta actividad se debe a que cuando el péptido entra en contacto con la membrana celular de la bacteria, la molécula adopta una estructura alfa-helicoidal anfifílica la cual provoca la desestabilización de la membrana (Diep *et al.*, 2009). Por otra parte, un estudio de Spinler *et al.* (2008) también reportó un efecto inhibitorio importante sobre *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 334 por parte del sobrenadante del cultivo de *L. reuteri* ATCC 5289, el cual podría deberse a la presencia de la bacteriocina.

Una forma de evaluar el mecanismo de acción de las bacteriocinas, asociado a lisis celular, es mediante estudios de microscopía electrónica, en donde se puede visualizar la disrupción de la membrana o la eventual formación de poros en éstas

(Tong *et al.*, 2011). En el presente estudio se había propuesto realizar estos análisis, con el fin de evaluar los cambios morfológicos de las especies bajo el efecto de la bacteriocina. Sin embargo, no fue posible ejecutarlos debido a la degradación de la bacteriocina purificada, ocasionada por pérdidas en la cadena de frío de almacenamiento de la molécula, debido a fallas externas que generaron una extendida interrupción en el suministro eléctrico en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral.

Los resultados obtenidos en este estudio respecto al efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de la especie *Streptococcus mutans* ATCC 25175 señalan una actividad inhibitoria estadísticamente significativa obteniendo una CI_{50} de $1,52 \pm 1,0$ $\mu\text{g/ml}$. No obstante, se aprecia un efecto menor en comparación con lo observado en *L. casei* ATCC 4646. Si bien las curvas de crecimiento muestran una tendencia a la disminución en el crecimiento, en relación con el aumento de la concentración de la bacteriocina, estas diferencias son menos evidentes en contraste a las curvas obtenidas en el ensayo de *L. casei*.

Liang *et al.* (2020) evaluó el efecto del péptido gassericina A de 5,7 kDa (propuesto también como reutericina 6) sintetizado *in vitro*, sobre la biopelícula de *S. mutans* ATCC 25175 *in vitro*, determinando que este péptido antimicrobiano tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de esta especie. Esto se condice con los resultados de este estudio sobre el mismo microorganismo. Sin embargo, es necesario resaltar que la bacteriocina aislada en este estudio posee un tamaño de 2,7 kDa siendo una molécula diferente a gassericina A.

Yu *et al.* (2020) evaluó el efecto de los sobrenadantes de los cultivos de los probióticos *L. reuteri* ATCC 5289 y *S. oligofermentans* DSM 8249 sobre *S. mutans* DSM 20523 *in vitro*, en donde se demostró que el sobrenadante del cultivo de *L. reuteri* es capaz de reducir la actividad metabólica y sobrevivencia de *S. mutans* de manera significativa. Es importante mencionar que en dicho estudio se evidenció que el probiótico es capaz de producir distintos factores y moléculas con capacidad antimicrobiana además de bacteriocinas, como H_2O_2 , reuterina y otros productos; y que la producción de éstos es específica según el ambiente, lo que podría explicar

las diferencias en relación con la actividad metabólica sobre los distintos microorganismos.

Finalmente, los resultados obtenidos del efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de *Streptococcus sanguinis* SK36 indican que para ninguna de las distintas concentraciones utilizadas hubo inhibición estadísticamente significativa. Más aún, se puede apreciar en la figura 4 que en los grupos en donde se añadió la molécula el crecimiento fue levemente mayor en comparación al grupo donde no se incorporó; sin embargo, esta diferencia tampoco es significativa, de modo que los resultados de este trabajo indicarían por primera vez que esta molécula proveniente de la bacteria probiótica *L. reuteri* ATCC 5289 no afecta el crecimiento del microorganismo comensal *S. sanguinis* SK36. Actualmente no existen estudios en donde se vea un efecto comparable tanto de Plantaricina-A o bien del sobrenadante de cepas de *L. plantarum* o *L. reuteri* sobre *S. sanguinis*; lo cual puede deberse a que al ser considerada una bacteria comensal, las líneas de trabajo investigativas no estarían orientadas en evaluar el efecto de péptidos antimicrobianos sobre esta especie, sino más bien directamente sobre microorganismos considerados patobiontes o asociados a enfermedades.

Zhu *et al.* (2010) investigaron el efecto de un yogurt conformado por cuatro microorganismos probióticos (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* sp.) sobre patógenos periodontales, en donde incluyeron a *S. sanguinis* ATCC 10556 como especie comensal y benéfica para la salud periodontal. Sus resultados concluyeron que las especies probióticas investigadas son capaces de inhibir patógenos periodontales específicos sin tener efecto sobre *S. sanguinis* ATCC 10556; lo que implicaría que las bacteriocinas producidas por los probióticos evaluados tampoco tienen efecto sobre aquella especie. Este resultado es comparable parcialmente con nuestro trabajo, ya que no es factible sortear las demás moléculas presentes en el medio, las cuales posiblemente modularían de una forma u otra el mecanismo de la bacteriocina y su actividad antibacteriana.

Es de particular interés comparar los resultados obtenidos del efecto de la bacteriocina sobre las dos especies del género *Streptococcus* evaluadas en este

estudio, puesto que se dieron respuestas significativamente distintas entre *S. mutans* ATCC 25175 y *S. sanguinis* SK36 bajo las mismas condiciones experimentales. Esto podría sugerir la existencia de mecanismos adaptativos que podrían ser nicho-dependientes y que toman relación con lo señalado anteriormente sobre la producción de otras moléculas liberadas al medio por parte de cada especie. Otra explicación de este fenómeno podría ser que a nivel de membrana celular existan diferencias estructurales entre una especie y otra, lo que impediría la acción antibacteriana de la molécula asociada a lisis celular; o incluso que exista una modulación del metabolismo a través de distintos receptores de membrana de una forma completamente distinta entre cada bacteria.

A la fecha, no se han publicado estudios que evalúen la CI_{50} de Plantaricina-A sobre los microorganismos evaluados en este trabajo. No obstante, un estudio realizado en 2014 determinó la actividad inhibitoria de las Plantaricinas E/F/J/K sobre distintas bacterias acidolácticas, estableciendo la CI_{50} en un rango de 0,09~1,5 $\mu\text{g/ml}$ (Pal & Srivastava, 2014). Estos valores son similares a los obtenidos en nuestro estudio.

Por otra parte, también es importante resaltar que el mayor efecto inhibitorio fue sobre *L. casei* ATCC 4646, obteniendo una CI_{50} de la bacteriocina de $0,53 \pm 0,17$ $\mu\text{g/ml}$, siendo menor en comparación con la CI_{50} de $1,52 \pm 1,0$ $\mu\text{g/ml}$ para *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Esto se condice con lo reportado en estudios sobre el espectro de inhibición de las bacteriocinas producidas por bacterias acidolácticas y *Bifidobacterium* spp., las cuales presentan mayor toxicidad frente a especies relacionadas y filogenéticamente cercanas a las productoras (Hatakka & Saxelin, 2008). Sin embargo, el péptido analizado en este estudio debe ser considerado como una bacteriocina de amplio espectro según lo publicado en la literatura, puesto que es capaz de presentar acción inhibitoria frente a bacterias pertenecientes a otro género distinto a la especie productora, como se evidenció en este estudio con *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Negash & Tsehai, 2020).

El presente estudio postuló la hipótesis de que *L. reuteri* ATCC 5289 es capaz de producir una bacteriocina la cual presenta actividad antibacteriana selectiva frente a microorganismos orales asociados a salud y enfermedad. Analizados los resultados de la investigación, tanto *in silico* como *in vitro*, realizada en este trabajo,

es posible confirmar que la cepa probiótica *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 5289 presenta una bacteriocina con características de peso molecular, punto isoeléctrico y composición aminoacídica definida; y que ésta presenta actividad antibacteriana diferencial sobre las especies asociadas a enfermedad de caries *L. casei* ATCC 4646 y *S. mutans* ATCC 25175, sin expresar actividad inhibitoria sobre la especie comensal *S. sanguinis* SK36, validándose la hipótesis propuesta.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la producción y posterior caracterización de una bacteriocina secretada por *L. reuteri* ATCC 5289; y si esta molécula presenta actividad antibacteriana específica sobre microorganismos asociados tanto a salud oral como enfermedad de caries, en donde se concluye que:

- 1.- *L. reuteri* ATCC 5289 es capaz de producir y secretar una bacteriocina al medio externo.
- 2.- La bacteriocina presenta un efecto inhibitorio en el crecimiento de *L. casei* ATCC 4646 y *S. mutans* ATCC 25175. No se observó un efecto inhibitorio sobre *S. sanguinis* SK36 en las condiciones de este estudio.

Estos resultados sugieren que la bacteriocina producida por *L. reuteri* cumple un rol en la actividad antibacteriana sobre otros microorganismos, la cual es dependiente de la especie involucrada y su entorno.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 49, Issue 1, pp. 1–11). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>
- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. H., & Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic Activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two New Two-Peptide Bacteriocins, Plantaricins EF and JK, and the Induction Factor Plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2269. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2269-2272.1998>
- Arweiler, N. B., & Netuschil, L. (2016). The oral microbiota. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 902, pp. 45–60). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. In *Microbiome* (Vol. 8, Issue 1, p. 103). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bravo, J., Morales, A., Lefimil, C., Galaz, C., & Gamonal, J. (2018). Efectos clínicos de *Lactobacillus reuteri* en el tratamiento de la gingivitis: Ensayo clínico aleatorizado controlado. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 11(1), 32–35. <https://doi.org/10.4067/S0719-01072018000100032>
- Bustamante, M., Oomah, B. D., Mosi-Roa, Y., Rubilar, M., & Burgos-Díaz, C. (2020). Probiotics as an Adjunct Therapy for the Treatment of Halitosis, Dental Caries and Periodontitis. In *Probiotics and Antimicrobial Proteins* (Vol. 12, Issue 2, pp. 325–334). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9521-4>

- Cagetti, M. G., Mastroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P., & Campus, G. (2013). The use of probiotic strains in caries prevention: A systematic review. In *Nutrients* (Vol. 5, Issue 7, pp. 2530–2550). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu5072530>
- Cannon, M. L., Vorachek, A., Le, C., & White, K. (2019). Retrospective review of oral probiotic therapy. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *43*(6), 367–371. <https://doi.org/10.17796/1053-4625-43.6.1>
- Chen, H., & Jiang, W. (2014). Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Frontiers in Microbiology*, *5*(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00508>
- Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., & Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, *30*(8), 1562–1574. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2009.05.014>
- Ericson, D., Hamberg, K., Bratthall, G., Sinkiewicz-Enggren, G., & Ljunggren, L. (2013). Salivary IgA response to probiotic bacteria and mutans streptococci after the use of chewing gum containing *Lactobacillus reuteri*. *Pathogens and Disease*, *68*(3), 82–87. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12048>
- Gobbi, E., De Francesco, M. A., Piccinelli, G., Caruso, A., Bardellini, E., & Majorana, A. (2020). In vitro inhibitory effect of two commercial probiotics on chromogenic actinomycetes. *European Archives of Paediatric Dentistry*, *21*(6), 673–677. <https://doi.org/10.1007/s40368-020-00512-2>
- Goh, H. F., & Philip, K. (2015). Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Weissella confusa* A3 of Dairy Origin. *PLOS ONE*, *10*(10), e0140434. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0140434>
- Gruner, D., Paris, S., & Schwendicke, F. (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. In *Journal of Dentistry* (Vol. 48, pp. 16–25). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.002>
- Hammami, R., Zouhir, A., Ben Hamida, J., & Fliss, I. (2007). BACTIBASE: A new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*,

7(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-89>

Hasslöf, P., & Stecksén-Blicks, C. (2019). Chapter 10: Probiotic bacteria and dental caries. In *Monographs in Oral Science* (Vol. 28, pp. 99–107). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000455377>

Hatakka, K., & Saxelin, M. (2008). Probiotics in intestinal and non-intestinal infectious diseases--clinical evidence. *Current Pharmaceutical Design*, *14*(14), 1351–1367. <https://doi.org/10.2174/138161208784480162>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2014.66>

Jalasvuori, H., Haukioja, A., & Tenovuo, J. (2012). Probiotic *Lactobacillus reuteri* strains ATCC PTA 5289 and ATCC 55730 differ in their cariogenic properties in vitro. *Archives of Oral Biology*, *57*(12), 1633–1638. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2012.07.014>

Jiang, Q., Liu, J., Chen, L., Gan, N., & Yang, D. (2019). The oral microbiome in the elderly with dental caries and health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*(JAN), 442. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00442>

Jones, S. E., & Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-35>

Jørgensen, M. R., Keller, M. K., Kragelund, C., Hamberg, K., Ericson, D., Nielsen, C. H., & Twetman, S. (2016). *Lactobacillus reuteri* supplements do not affect salivary IgA or cytokine levels in healthy subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *74*(5), 399–404. <https://doi.org/10.3109/00016357.2016.1169439>

Kabuki, T., Saito, T., Kawai, Y., Uemura, J., & Itoh, T. (1997). Production, purification

- and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2), 145–156. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01180-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01180-4)
- Kandler, O., Stetter, K.-O., & Köhl, R. (1980). *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a New Species of Heterofermentative Lactobacilli. *Zentralblatt Für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, Angewandte Und Ökologische Mikrobiologie*, 1(3), 264–269. [https://doi.org/10.1016/s0172-5564\(80\)80007-8](https://doi.org/10.1016/s0172-5564(80)80007-8)
- Kang, M. S., Oh, J. S., Lee, H. C., Lim, H. S., Lee, S. W., Yang, K. H., Choi, N. K., & Kim, S. M. (2011). Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *The Journal of Microbiology* 2011 49:2, 49(2), 193–199. <https://doi.org/10.1007/S12275-011-0252-9>
- Kaur, R., Gilbert, S. C., Sheehy, E. C., & Beighton, D. (2013). Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 23(1), 32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2011.01220.x>
- Kawai, Y., Ishii, Y., Uemura, K., Kitazawa, H., Saito, T., & Itoh, T. (2001). *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiology*, 18(4), 407–415. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0412>
- Keller, M. K., Bardow, A., Jensdottir, T., Lykkeaa, J., & Twetman, S. (2012). Effect of chewing gums containing the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. *Acta Odontologica Scandinavica*, 70(3), 246–250. <https://doi.org/10.3109/00016357.2011.640281>
- Kreth, J., Giacaman, R. A., Raghavan, R., & Merritt, J. (2017). The road less traveled - defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. *Molecular Oral Microbiology*, 32(3), 181–196. <https://doi.org/10.1111/OMI.12170>
- Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. J. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. In *Oral Diseases* (Vol. 23, Issue 3, pp. 276–286). Blackwell Publishing Ltd.

<https://doi.org/10.1111/odi.12509>

- Liang, J., Liang, D., Liang, Y., He, J., Zuo, S., & Zhao, W. (2020). Effects of a derivative of reuterin 6 and gasserin A on the biofilm of *Streptococcus mutans* in vitro and caries prevention in vivo. *Odontology* 2020 109:1, 109(1), 53–66. <https://doi.org/10.1007/S10266-020-00529-5>
- Lozano, C. P., Díaz-Garrido, N., Kreth, J., & Giacaman, R. A. (2019). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* Expression of Competition-Related Genes, Under Sucrose. *Caries Research*, 53(2), 194–203. <https://doi.org/10.1159/000490950>
- MacHiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., Maltz, M., Manton, D. J., Martignon, S., Martinez-Mier, E. A., Pitts, N. B., Schulte, A. G., Splieth, C. H., Tenuta, L. M. A., Ferreira Zandona, A., & Nyvad, B. (2020). Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. In *Caries Research* (Vol. 54, Issue 1, pp. 7–14). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000503309>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 1. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC240>
- Mahasneh, S. A., & Mahasneh, A. M. (2017). Probiotics: A promising role in dental health. In *Dentistry Journal* (Vol. 5, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/dj5040026>
- Marsh, P. D., & Zaura, E. (2017). Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, S12–S22. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12679>
- MINSAL. (2017). *Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030*. Ministerio de salud, Gobierno de Chile.
- Mosaddad, S. A., Tahmasebi, E., Yazdanian, A., Rezvani, M. B., Seifalian, A.,

- Yazdanian, M., & Tebyanian, H. (2019). Oral microbial biofilms: an update. In *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 38, Issue 11, pp. 2005–2019). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03641-9>
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue APR, p. 757). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. In *International Journal of Microbiology* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Nikawa, H., Makihiro, S., Fukushima, H., Nishimura, H., Ozaki, Y., Ishida, K., Darmawan, S., Hamada, T., Hara, K., Matsumoto, A., Takemoto, T., & Aimi, R. (2004). *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.006>
- Nilsen, T., Nes, I. F., & Holo, H. (2003). Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2975. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003>
- Pal, G., & Srivastava, S. (2014). Cloning and heterologous expression of plnE, -F, -J and -K genes derived from soil metagenome and purification of active plantaricin peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1441–1447. <https://doi.org/10.1007/S00253-013-5097-1>
- Peres, M. A., D Macpherson, L. M., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Keller Celeste, R., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benzan, H., Allison, P., & Watt, R. G. (2019). Oral health 1 Oral diseases: a global public health challenge. In *www.thelancet.com* (Vol. 394). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries.

Nature Reviews Disease Primers, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>

- Riquelme, N. (2018). *Efecto de Bifidobacterium dentium sobre Lactobacillus casei a través de quorum sensing, mediado por autoinductor-2*. Universidad de Chile.
- Rodríguez, G., Ruiz, B., Faleiros, S., Vistoso, A., Marró, M. L., Sánchez, J., Urzúa, I., & Cabello, R. (2016). Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial. *Journal of Dental Research*, 95(4), 402–407. <https://doi.org/10.1177/0022034515623935>
- Sánchez, J. (2020). *Producción de autoinductor-2 por Lactobacillus salivarius SC18 y sus efectos en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas*. Universidad de Chile.
- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 Suppl 2(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1086/523341>
- Sandoval, F., Faleiros, S., Cabello, R., Díaz-Dosque, M., Rodríguez, G., & Escobar, A. (2021). The consumption of milk supplemented with probiotics decreases the occurrence of caries and the salivary concentration of hβD-3 in children. *Clinical Oral Investigations*, 25(6), 3823–3830. <https://doi.org/10.1007/S00784-020-03712-8>
- Savino, F., Ceratto, S., Poggi, E., Cartosio, M. E., Cordero di Montezemolo, L., & Giannattasio, A. (2015). Preventive effects of oral probiotic on infantile colic: A prospective, randomised, blinded, controlled trial using *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Beneficial Microbes*, 6(3), 245–251. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0090>
- Sebastián-Domingo, J. J., & Sánchez-Sánchez, C. (2018). From the intestinal flora to the microbiome. In *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas* (Vol. 110, Issue 1, pp. 51–56). ARAN Ediciones S.A. <https://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>
- Seguel, J. (2020). *Efecto del uso tópico/sistémico del probiótico Lactobacillus rhamnosus en la densidad mineral, microdureza superficial y morfología*

superficial de esmalte en un modelo de caries in situ. Universidad de Chile.

- Seminario-Amez, M., López-López, J., Estrugo-Devesa, A., Ayuso-Montero, R., & Jané-Salas, E. (2017). Probiotics and oral health: A systematic review. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 22(3), e282–e288. <https://doi.org/10.4317/MEDORAL.21494>
- Sinkiewicz, G. (2010). *Lactobacillus reuteri in health and disease* [Malmö University]. <http://hdl.handle.net/2043/10570>
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. Ben, Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 45, Issue 1, pp. 1–24). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- Spinler, J. K., Taweechoatipatr, M., Rognerud, C. L., Ou, C. N., Tumwasorn, S., & Versalovic, J. (2008). Human-Derived Probiotic *Lactobacillus reuteri* Demonstrate Antimicrobial Activities Targeting Diverse Enteric Bacterial Pathogens. *Anaerobe*, 14(3), 166. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2008.02.001>
- Stensson, M., Koch, G., Coric, S., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Birkhed, D., & Wendt, L. K. (2014). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age. *Caries Research*, 48(2), 111–117. <https://doi.org/10.1159/000354412>
- Sung, V., D'Amico, F., Cabana, M. D., Chau, K., Koren, G., Savino, F., Szajewska, H., Deshpande, G., Dupont, C., Indrio, F., Mentula, S., Partty, A., & Tancredi, D. (2018). *Lactobacillus reuteri* to treat infant colic: A meta-analysis. In *Pediatrics* (Vol. 141, Issue 1). American Academy of Pediatrics. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-1811>
- Szkaradkiewicz, A. K., Stopa, J., & Karpiński, T. M. (2014). Effect of Oral Administration Involving a Probiotic Strain of *Lactobacillus reuteri* on Pro-Inflammatory Cytokine Response in Patients with Chronic Periodontitis.

Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 62(6), 495–500.
<https://doi.org/10.1007/S00005-014-0277-Y/TABLES/2>

- Tanner, A. C. R., Kent, R. L., Holgerson, P. L., Hughes, C. V., Loo, C. Y., Kanasi, E., Chalmers, N. I., & Johansson, I. (2011). Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *Journal of Dental Research*, 90(11), 1298–1305. <https://doi.org/10.1177/0022034511421201>
- Toba, T., Samant, S. K., Yoshioka, E., & Itoh, T. (1991). Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Letters in Applied Microbiology*, 13(6), 281–286. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00629.x>
- Tong, Z., Zhou, L., Jiang, W., Kuang, R., Li, J., Tao, R., & Ni, L. (2011). An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides*, 32(10), 2021–2026. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.09.002>
- Twetman, S. (2018). Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *European Journal of Oral Sciences*, 126, 19–25. <https://doi.org/10.1111/eos.12528>
- Twetman, S., Jørgensen, M. R., & Keller, M. K. (2017). Fifteen Years of Probiotic Therapy in the Dental Context: What Has Been Achieved? *Journal of the California Dental Association*, 45(10), 539–545. https://www.cda.org/Portals/0/journal/journal_102017.pdf
- van Heel, A. J., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2013). BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT391>
- Van Heel, A. J., De Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W278–W281. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY383>

- Vestman, N. R., Chen, T., Holgerson, P. L., Öhman, C., & Johansson, I. (2015). Oral Microbiota Shift after 12-Week Supplementation with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and PTA 5289; A Randomized Control Trial. *PloS One*, *10*(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0125812>
- Vicario, M., Santos, A., Violant, D., Nart, J., & Giner, L. (2013). Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: A preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontologica Scandinavica*, *71*(3–4), 813–819. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.734404>
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. In *Pharmacological Research* (Vol. 69, Issue 1, pp. 137–143). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
- Wasfi, R., Abd El-Rahman, O. A., Zafer, M. M., & Ashour, H. M. (2018). Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(3), 1972–1983. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13496>
- Wattanarat, O., Makeudom, A., Sastraruji, T., Piwat, S., Tianviwat, S., Teanpaisan, R., & Krisanaprakornkit, S. (2015). Enhancement of salivary human neutrophil peptide 1-3 levels by probiotic supplementation. *BMC Oral Health*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/S12903-015-0003-0>
- Wolff, D., Frese, C., Maier-Kraus, T., Krueger, T., & Wolff, B. (2013). Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects. *Caries Research*, *47*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1159/000344022>
- Yu, H., Ganas, P., & Schwendicke, F. (2020). Environment-Specific Probiotic Supernatants Modify the Metabolic Activity and Survival of *Streptococcus mutans* in vitro. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1447. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01447>
- Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Han, X., & Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese

traditional fermented milk. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 2165. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02165>

Zhang, Y., Wang, X., Li, H., Ni, C., Du, Z., & Yan, F. (2018). Human oral microbiota and its modulation for oral health. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 99, pp. 883–893). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zhu, Y., Xiao, L., Shen, D., & Hao, Y. (2010). Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica*, 68(5), 261–268. <https://doi.org/10.3109/00016357.2010.492235>

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1.

Tabla 3. Tabla comparativa de las 137 secuencias de bacteriocinas de la base de datos BactiBase y el alineamiento a través del software BLASTp con los genomas disponibles de *L. reuteri*.

Nombre bacteriocina	Clasificación bacteriocina	Productora según base de datos Bactibase	secuencia de aminoácidos	% de similitud en <i>L. reuteri</i>	descripción BLASTp
Acidocin 8912	Unclassified	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KTHYPTNAWKSLWKGFWESLRYTDGF	61,4	ATP-binding cassette domain-containing protein
Acidocin A	class IIA/YGNGV	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KTYYGTVNGVHCTKKSLWGVRLKNVIPGTL CRKQSLPIKQDLKILLGWATGAFGKTFH	80	isoleucine--tRNA ligase
Acidocin B (AcdB)	Unclassified	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NIYWIADQFGIHLATGTARKLLDAVASGASL GTAF AAILGVTLPAWALAAAGALGATAA	52,9	sugar porter family MFS transporter
Acidocin J1132 β	Class IIb	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	GNPKVAHCASQIGRSTAWGAVSGA	NS	
Acidocin LF221B (Gassericin K7 B)	Unclassified	<i>Lactobacillus gasseri</i>	NKWGNVIGAAATGATRGVSWCRGFGPWG MTACALGGAAIGGYLGYKSN	64,7	Blp family class II bacteriocin
Aureocin A53	Unclassified	<i>Staphylococcus aureus</i>	MSWLNFLKYIAKYGKKAVSAAWKYKGVLE WLVNGPTLEWVWQKLKKIAGL	NS	
Avicin A	class IIA/YGNGV	<i>Enterococcus avium</i>	TYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAISIIGNNSA ANLATGGAAGWKS	-	-
Bacillocin 1580	Class IIa	<i>Bacillus circulans</i>	VNYGNGVSCSKTKCSVNWGIITHQAFRVTS GVASG	-	-
Bacillocin 602	Class IIa	<i>Paenibacillus polymyxa (Bacillus polymyxa)</i>	ATYYGNGLYCNKQKHWTVDWNKASREIG KIIVNGWVQH	NS	
Bacillocin B37	Unclassified	<i>Paenibacillus polymyxa (Bacillus polymyxa)</i>	FVYGNVTSILVQAQFLVNGQRRFFYTPDK	81,8	hypothetical protein

Bacteriocin 31	Unclassified	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	ATYYGNGLYCNKQKCWVDWNKASREIGKII VNGNVQHGPWAPR	52,1	acetyltransferase
Bacteriocin E50-52	Unclassified	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)	TTKNYGNNGVCNSVNWCQCGNVWASCNLA TGCAAWLCKLA	-	-
Bacteriocin J46	Unclassified	<i>Lactococcus lactis</i>	KGGSGVIHTISHEVIYNSWNFVFTCCS	85,7	DUF262 domain- containing protein
Bacteriocin L-1077	Class IIa	<i>Lactobacillus salivarius</i> L-1077 (NRRL B- 50053)	TNYGNNGVGPDAIMAGIIKLIFIFNIRQGYNF GKKAT	NS	
Bacteriocin T8	class IIa	<i>Enterococcus faecium</i> T8	TYYGNGLYCNKEKCWVDWNQAKGEIGKIIV NGWVNH	NS	
Bavaricin-A	class IIA/YGNGV	<i>Lactobacillus sakei</i>	KYYGNNGVHXGKHSXTVDWGTAIGNIGNNAA ANXATGXNAGG	NS	
Bavaricin-MN	class IIA/YGNGV	<i>Lactobacillus sakei</i>	TKYYGNNGVYCNSKKCWVDWGQAAGGIGQ TVVXGWLGGAI PGK	NS	
Boticin B	Unclassified	<i>Clostridium botulinum</i>	MQKPEIISADLGLCAVNEFVALAAIPGGAATF AVCQMPNLDEIVSNAAYV	-	-
Brevicin 27	Unclassified	<i>Lactobacillus brevis</i> SB27	KKXXKKVAXTWGNAATAAASGAVKGILG		
Brochocin-c	Unclassified	<i>Brochothrix campestris</i>	YSSKDCLKDIGKIGAGTVAGAAGGGLAAG LGAIPGAFVGAHFGVIGG	NS	Blp family class II bacteriocin
Carnobacteriocin B2 (Carnocin CP52)	class IIA/YGNGV	<i>Carnobacterium piscicola</i>	VNYGNNGVSCSKTKCSVNWGQAFQERYTAG INSFVSGVASGAGSIGRRP	66,7	hypothetical protein
Carnobacteriocin BM1 (Carnobacteriocin B1)	class IIA/YGNGV	<i>Carnobacterium piscicola</i>	AISYGNNGVYCNEKCWVNKAENKQAITGIVI GGWASSLAGMGH	-	-

Carnobacteriocin-A (Piscicolin-61)	class IIc, non subgrouped bacteriocins	<i>Carnobacterium piscicola</i>	DQMSDGVNYGKGSLSKGGAKCGLGIVGG LATIPSGPLGWLAGAAGVINSCKM	NS	
Carnocin UI49	lantibiotic	<i>Carnobacterium sp (strain UI49)</i>	GSEIQPR		
Carnocyclin-A	Unclassified	<i>Carnobacterium maltaromaticum (Carnobacterium piscicola)</i>	LVAYGIAQQTAEKVVSLINAGLTVGSIISILGG VTVGLSGVFTAVKAAIAKQGIKKAIQL	-	-
Cerein 7B	Unclassified	<i>Bacillus cereus Bc7 (CECT 5148)</i>	GWWNSWGKCVAGTIGGAGTGGLGGAAAG SAVPVIGTGIGGAIGGVSGGLTGAATFC	62,5	phage tail tape measure protein
Circularin A	Unclassified	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	MSLLALVAGTLGVSQSIATTVVSIVLTGSTLIS IILGITAILSGGVDAILEIGWSAFVATVKKIVAE RGKAAAIW	-	-
Clostinin 574	Unclassified	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	PNWTKIGKCAWSIAWAIGSGLFGGAKLIKIKK YIAELGGLQKAAKLLVGATTWEEKLHAGGY ALINLAAELTGAVIQANCF	NS	
Coagulin A	Unclassified	<i>Bacillus coagulans</i>	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGWKATTCIINNGA MAWATGGHQGTHKC	NS	
Colicin-V (Microcin-V)	Unclassified	<i>Escherichia coli</i>	ASGRDIAMAIGTLSGQFVAGGIGAAAGGVA GGAIYDYASTHKPNPAMSPSGLGGTIKQKP EGIPSEAWNYAAGRLCNWSPNNLSDVCL	40	tape measure protein
Curvacin-A	class IIA/YGNGV	<i>Lactobacillus curvatus</i>	ARSYNGVYCNKKCWVNRGEATQSIIGG MISGWASGLAGM	-	-
Curvalicin-28a	Unclassified	<i>Lactobacillus curvatus</i>	TPVVNPPFLQQT		
Curvalicin-28b	Unclassified	<i>Lactobacillus curvatus</i>	VAPFPEQFLX		
Curvalicin-28c	Unclassified	<i>Lactobacillus curvatus</i>	NIPQLTPTP		
Curvaticin FS47	Unclassified	<i>Lactobacillus curvatus</i>	YTAKQCLQAIGSCGIAGTGAGAAGGPAGAF VGAXVVXI	NS	
Curvaticin L442	Unclassified	<i>Lactobacillus curvatus L442</i>	AYPGNGVHCGKYSCTVDKQTAIGNIGNNAA	73,3	YSIRK-type signal peptide-containing protein

Divercin V41	class IIa/YGNV	<i>Carnobacterium divergens</i>	TKYYGNGVYCNSKKCWVDWQGASGCIGQT VVGWLGGAIPGKC	NS	
Divergin 750	Unclassified	<i>Carnobacterium divergens</i>	KGILGKLGVVQAGVDFVSGVWAGIKQSAKD HPNA	55,5	lytic transglycosylase
Divergin A	Class IIc	<i>Carnobacterium divergens</i>	AAPKITQKQKNCVNGQLGGMLAGALGGPG GVVLGGIGGAIAGGCFN	NS	
Divergin M35	class IIa/YGNV	<i>Carnobacterium divergens (Lactobacillus divergens)</i>	TKYYGNGVYCNSKKCWVDWGTAAQGCIDVV IGQLGGGIPGKGC	NS	
Durancin Q	Unclassified	<i>Enterococcus durans</i>	MQTIKELNTMELQEIIIGGENDHRMPYELNRP NNLSKGGAKCAAGILGAGLGAVGGPGGFI SAGISAVLGCM	46,4	phage tail tape measure protein
Durancin TW-49M	Unclassified	<i>Enterococcus durans QU 49</i>	ENDHRMPYELNRPNNLSKGGAKCAAGILGA GLGAVGGPGGFISAGISAVLGCM	46,4	phage tail tape measure protein
Dysgalacticin	Unclassified	<i>Streptococcus equisimilis</i>	NETNNFAETQKEITTNSEATLTNEDYTKLTS EVKTIYTNIQYDQTKNKFYVDEDKTEQYYN YDESIGVYLMKDSLDELNNNNSSNYSEI INQKISEIDYVLQGNNDINNLIPIPNTRVKRSAD FSWIQRCLLEAWGYAISLVTLKGIINLFKAGK FEAAAKLASATAGRIAGMAALFAFVATCGA TTVS	NS	
Enterocin 7A (Enterocin L50A)	bacteriocins without sequence leader	<i>Enterococcus faecium (Streptococcus faecium)</i>	MGAIAKLVAKFGWPIVKKYYKQIMQFIGEGW AINKIIDWIKKHI	NS	
Enterocin 96	Class II	<i>Enterococcus faecalis</i>	MSKRDCNLMKACCAGQAVTYAIHSLNRLG GDSSDPAGCNDIVRKYCK	-	-
Enterocin A	Class IIa, IIc (problematic)	<i>Enterococcus faecium (Streptococcus faecium)</i>	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCI AGMSIGGFLGGAIPGKC	-	-
Enterocin AS-48 (BACTERIOCIN AS-48)	Unclassified	<i>Enterococcus faecalis (Streptococcus faecalis)</i>	MAKEFGIPA AVAGTVLNVVEAGGWTTIVSI LTA VGSGGLSLLAAAGRESIKAYLKKEIKKK GKRAVIAW	36,9	MULTISPECIES: molybdopterin molybdotransferase MoeA

Enterocin B	class IIc, non subgrouped bacteriocins (problematic)	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)	ENDHRMPNELNRPNNLSKGGAKCGAAIAG GLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN	NS	
Enterocin CRL35 (Mundticin KS)	Class IIa	<i>Enterococcus mundtii</i>	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSA ANLATGGAAGWKS	-	-
Enterocin HF	class IIa	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNAA ANLTTGGKAGWKG	NS	
Enterocin K1	Leaderless	<i>Enterococcus faecium</i> <i>EnGen0026</i>	MKFKFNPTGTIVKKLTQYEIAWFKNKHGYYP WEIPRC	36,3	ISL3-like element ISSt1 family transposase
Enterocin NKR-5-3B (Ent53B)	Circular	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>NKR-5-3</i>	LTANLGISSYAAKKVIDIINTGSAVATIIALVTA VVGGLITAGIVATAKSLIKKYGAKYAAAW	-	-
Enterocin P	Class IIa, IIb and IIc (problematic)	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)	ATRSYGNGVYCNSKWCWVNWGEAKENIAG IVISGWASGLAGMGH	NS	
Enterocin Q	Class IIc	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)	MNFLKNGIAKWMTGAELQAYKKKYGCLPW EKISC	53,8	Ferrochelataze, protoheme ferro- lyase
Enterocin SE-K4	Class IIa	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	ATYYGNGVYCNKQKCVWDWSRARSEIIDR GVKAYVNGFTKVLGGIGGR	NS	
Enterocin Xalpha	Class IIb	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)	SNDLWYGVGQFMGKQANCITNHPVKHMII PGYCLSKILG	57,1	phosphatase PAP2 family protein
Enterocin Xbeta	Class IIb	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)	IAPIIVAGLGYLVKDAWDHSDQIISGFKKGWN GGRRK	NS	
Enterolysin A	class III	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	ASNEWSWPLGKPYAGRYEEGQQFGNTAFN RGGTYFHDGDFGSAIYGNNGSVYAVHDGKI LYAGWDPVGGGSLGAFIVLQAGNTNVIYQE FSRNVDIKVSTGQTVKKGQLIGKFTSSHLH LGMTKKEWRSASHSSWNKDDGTWFNPIPILO	45,3	peptidoglycan DD- metalloendopeptida se family protein

			GGSTPTPPNPGPKNFTTNVRYGLRVLGGS WLPEVTNFNNTNDGFAGYPNRQHDMLYIKV DKGQMKYRVHTAQSGWLPWVSKGDKSDT VNGAAGMPGQAIDGVQLNYITPKGEKLSQA YYRSQTTKRSGWLKVSADNGSIPGLDSYAG IFGEPLDRLQIGISQSNPF		
Epidermicin NI01	Unclassified	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 224	MAAFMKLIQFLATKGQKYVSLAWKHKGITLK WINAGQSFEWIYKQIKKLWA	NS	
Fulvocin-C	Unclassified	<i>Myxococcus fulvus</i>	ANCSCSTASDYCPILTFCTTGTACSYPPTGC GTGWVYCACNGNFY	NS	
Garvicin A	Ild	<i>Lactococcus garvieae</i>	IGGALGNALNGLGTWANMMNGGGFVNQW QVYANKGKINQYRPY	NS	
Garvicin ML	Unclassified	<i>Lactococcus garvieae</i>	LVATGMAAGVAKTIVNAVSAGMDIATALSIF SGAFTAAGGIMALIKKYAQKKLWKQLIAA	NS	
Gassericin A	Unclassified	<i>Lactobacillus gasseri</i>	IYWIADQFGIHLATGTARKLLDAMASGASLG TAFMAILGVTLPAWALAAAGALGATAA	NS	
Gassericin T (gassericin K7 B)	Unclassified	<i>Lactobacillus gasseri</i>	RNNWAANIGGVGATVAGWALGNAVCGPA CGFVG AHYVPIAWAGVTAATGGFGKIRK	67,3	Blp family class II bacteriocin
Glycocin F	Unclassified	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KPAWCWYTLAMCGAGYDSGTCDYMYSHC FGIKHHSSGSSSYHC	66,7	formate acetyltransferase
Halocin H4	Unclassified	<i>Halobacterium mediterranei</i> (<i>Haloferax mediterranei</i>)	DIAPPGPNGDPKSVQIDDKYTGAEMYGED FRVGLGTDLTMYPPVYRESLGNSSGGWEF DFTVCGSTACRFVDSNGDVKEDDKAKEMW WQEINFNDINQDLYSRNDSWVGSTPADTQ PEFDYTFALARDGVTLALTALNPAMGSLAL GATYFLSDMVNWIASQHEDDSSLKRKWDY DGLSGPLYADSSTYLLARDEMTSNSYESFTI DNIAVAFPEFPVRTKYVTFAPDDPSTQSI STLEEEGIYRVPATE	NS	
Helveticin-J	Unclassified	<i>Lactobacillus helveticus</i>	MKHLNETTNVRILSQFDMDTGYQAVVQKGN VGSKYVYGLQLRKGATTILRGYRGSKINNPI LELSGQAGGHTQTWEFAGDRKDINGEERA GQWFIGVKPSKIEGSKIWAKQIARVDLRNQ MGPHYSNTDFPRLSYLNRAGSNPFAGNKM	32,1	YSIRK-type signal peptide-containing protein

			THAEAAVSPDYTKFLIATVENNCIGHFTIYNL DTINEKLDEKGNSEVDNLETVKYEDSFIIDNL YGDDNNSIVNSIQGYDLNDNDGNIYISSQKAP DFDGSYYAHH		
Hiracin JM79	Class II sec-dependent	<i>Enterococcus hirae</i> <i>DCH5</i>	ATYYGNGLYCNKEKCWVDWNQAKGEIGKII VNGWVNHGPWAPRR	58,3	hypothetical protein
Lactacin-F (lafA)	class IIB	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	RNNWQTNVGGAVGSAMIGATVGGTICGPA CAVAGAHYLPILWTAVTAATGGFGKIRK	51,9	Blp family class II bacteriocin
Lactacin-F (lafX)	class IIB	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NRWGDTVLSAASGAGTGIKACKSFGPWGM AICGVGGAAIGGYFGYTHN	51,1	Blp family class II bacteriocin
Lacticin 3147 A1	Lantibiotic	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>), <i>lactis</i>	CSTNTFSLSDYWGNNGAWCTLTHECMAW CK	57,1	phage tail protein
Lacticin 3147 A2	Lantibiotic	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>), <i>lactis</i>	TTPATPAISILSAYISTNTCPTTKCTRAC	NS	
Lacticin 481 (Lactococcin DR)	Lantibiotic	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>), <i>lactis</i>	KGGSGVIHTISHECNMNSWQFVFTCCS	45,5	elongation factor G
Lactobin-A (Amylovorin-L471)	class IIB	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	NRWTNAYSALGCAVPGVKYGKLLGGVWG AVIGGVGGAAVCGLAGYVRKG	42,8	Blp family class II bacteriocin
Lactocin-705	Class IIb	<i>Lactobacillus paracasei</i>	GMSGYIQGIPDFLKGYLHGISAANKHKKGRL	NS	
Lactocin-S	Lantibiotic	<i>Lactobacillus sakei</i> L45	STPVLASVAVSMELLPTASVLYSDVAGCFKY SAKHHC	-	-
Lactococcin MMFII	class IIA/YGNGV	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>), <i>lactis</i>	TSYGNGVHCNKSCKWIDVSELETYKAGTVS NPKDILW	NS	
Lactococcin-A	Unclassified	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus cremoris</i>), <i>cremoris</i>	KLTFIQSTAAGDLYYNTNTHKYVYQQTQNAF GAAANTIVNGWMGGAAGGFLHH	34,3	hypothetical protein DKZ22_13690
Lactococcin-B	Unclassified	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus cremoris</i>), <i>cremoris</i>	SLQYVMSAGPYTWYKDTRTGKTICKQTIDT ASYTFGVMAEGWGKTFH	NS	

Lactococcin-G α	Unclassified	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i> (<i>Streptococcus lactis</i>)	GTWDDIGQGIGRVAYWVGKAMGNMSDVN QASRINRKKKH	-	-
Lactococcin-G β	Unclassified	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp (Streptococcus</i> <i>lactis), lactis</i>	KKWGWLAWVDPAYEFIKGFGKGAIKEGNK DKWKNI	NS	
Leucocin C	class IIA/YGNGV	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	KNYGNGVHCTKKGCSVDWGYAWTNIANNS VMNGLTGGNAGWHN	-	-
Leucocin N	Class IId	<i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i> QU 15	KGLGKLIGIDWLLGQAKDAVKQYKKDYKRW H	NS	
Leucocin Q	Class IId	<i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i> QU 15	KGLGKLIGIDWLLGQAKDAVKQYKKDYKRW H	NS	
Leucocin-A (Leucocin A-UAL 187)	class IIA/YGNGV	<i>Leuconostoc gelidum</i>	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRL ANGGNGFW	NS	
Leucocin-B	Unclassified	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	KGKGFWSWASKATSWLTGPQQPGSPLLKK HR	-	-
Leucocin-B (Leucocin B-Ta11a)	class IIA/YGNGV	<i>Leuconostoc carnosum</i>	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRL ANGGNGFW	NS	
Lichenin	Unclassified	<i>Bacillus licheniformis</i>	ISLEICXIFHDN	66,6	DUF72 domain- containing protein
Linocin M18	Unclassified	<i>Brevibacterium linens</i>	MNNLYRELAPIGPAWAEIEEEARRTFKRNI AGRRIVDVAGPTGFETSAVTTGHIRDVQSET SGLQVKQRIVQEYIELRTPFTVTRQAIDDVA RSGSDSDWQPVKDAATTIAMAEDRAILHGL DAAGIGGIVPGSSNAAVAIPDAVEDFADAVA QALSVLRTVGVDGPYSLLLSSAEYTKVSEST DHGYPIREHLRQLGAGEIIWAPALEGALLV STRGGDYELHLGQDLSIGYYSHDSETVELYL QETFGFLA	NS	

Listeriocin 743A	Class IIa	<i>Listeria innocua</i>	KSYGNGVQC�KKKCWVDWGSASTIGNNS AANWATGGAAGWKS	-	-
Mesentericin Y105	class IIA/YGNGV	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHRL ANGGNGFW	NS	
Microcin B17 (MccB17)	Unclassified	<i>Escherichia coli</i>	VGIGGGGGGGGGGGSCGGQGGGCGGCSN GCSGGNGGSGGSGSHI	-	-
Microcin E492	Unclassified	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GETDPNTQLLNDLGNNMAWGAALGAPGGL GSAALGAAGGALQTVGQGLIDHGPVNVPIPI VLIGPSWNGSGSGYNSATSSSSGSGS	NS	
Microcin-24	Unclassified	<i>Escherichia coli</i>	AGDPLADPNSQIVRQIMSNAAWGPPLVPER FRGMAVGAAGGVTQTVLQGAAAHMPVNVPI PKVPMGPSWNGSKG	NS	
Mundticin	class IIA/YGNGV	<i>Enterococcus mundtii</i>	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSA ANLATGGAAGWSK	-	-
Mundticin KS	Unclassified	<i>Enterococcus mundtii</i>	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSA ANLATGGAAGWKS	-	-
Mundticin L	class IIA/YGNGV	<i>Enterococcus mundtii</i>	KYYGNGLSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSA ANLATGGAAGWKS	-	-
Nisin A	Lantibiotic	<i>Lactococcus lactis subsp (Streptococcus lactis), lactis</i>	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIH VSK	-	-
Nukacin ISK-1	Lantibiotic	<i>Staphylococcus warneri</i>	KKKSGVIPTVSHDCHMNSFQFVFTCCS	NS	
Pediocin PA-1 (Pediocin ACH)	class IIA/YGNGV	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGA MAWATGGHQGNHCK	NS	
Penocin A	class IIA/YGNGV	<i>Pediococcus pentosaceus ATCC 25745</i>	KYYGNGVHCGKKTCTYVDWGQATASIGKIIV NGWTQHGPWAHR	NS	
Pentocin KCA1	Cyclic bacteriocin (Class V)	<i>Lactobacillus pentosus KCA1</i>	IVWLANKFGVHLTNHLTNSILNAVSNGSSLG SAFAVIAGVTLPGWAVAAGALGATAA	NS	
Piscicolin 126	class IIA/YGNGV	<i>Carnobacterium piscicola</i>	KYYGNGVSCNKNCTVDWSKAIGIIGNNAA ANLTTGGAAGWNKG	-	-

Pisciocin V1a	class IIa	<i>Carnobacterium piscicola</i>	KYYGNGVSCNKNKNGCTVDWSKAIGIIGNNAA ANLTTGGAAGWNKG	-	-
Pisciocin V1b	class IIa	<i>Carnobacterium piscicola</i>	AISYGNVYCNKEKCVNKAENKQAITGIVI GGWASSLAGMGH	-	-
Plantaricin 1.25 β	Unclassified	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KKKKKKVACTWGNAAATAASGAVXGILGGP TGALAGAIWGVQCASNNLHGMH	48,3	SHOCT domain- containing protein
Plantaricin 423	class IIa	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KYYGNGVTCGKHSCSVNWGQAFSCSVSHL ANFGHGKC	-	-
Plantaricin ASM1	Unclassified	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KPAWCWYTLAMCGAGYDSGTCDYMYSHC FGVKHSSGGGGSYHC	66,7	formate acetyltransferase
Plantaricin C19	Class IIa	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KYYGNGLSCSKKGCTVNWGQAFSCGVNRV ATAGHGK	NS	
Plantaricin E	Unclassified	<i>Lactobacillus plantarum</i>	FNRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKS IR	-	-
Plantaricin F	Class IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i>	VFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVR GFIHG	NS	
Plantaricin J	Class IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GAWKNFWSSLRKGFDGEAGRAIRR	70	tape measure protein
Plantaricin K	Unclassified	<i>Lactobacillus plantarum</i>	RRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLGGSRDY NK	NS	
Plantaricin NC8 α	Unclassified	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MDKFEKISTSNLEKISGGDLTTKLWSSWGY YLGKKARWNLKHPYVQF	NS	
Plantaricin NC8 β	Unclassified	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MNNLNKFSTLGKSSLSQIEGGSVPTS SVYTLG IKILWSAYKHKRTIEKSFNKG FYH	-	-
Plantaricin W α	Lantibiotic (two-peptide)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCKWWNISCDLGNNGHVCTLSHECQVSCN	NS	
Plantaricin W β	Lantibiotic (two-peptide)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	SGIPCTIGA AVAASIAVCPPTTKCSKRCKRK K	-	-
Plantaricin-A	IIc	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AYSLQMGATAIKQVKKLFFKKWGW	100	bacteriocin

Propionicin SM1	Unclassified	<i>Propionibacterium jensenii</i>	MNKTHKMATLVIAAILAAGMTAPTAYADSPG NTRITASEQSVLTQILGHKPTQTEYNRYVET YGSVPTEADINAYIEASESEGSSSQTAHDD STSPGTSTEIYTQAAPARFSMFFLSGTWITR SGVVSLSLKPRKGGIGNEGDERTWKTVDK FHNAGQWTRYKNNGVDASMKKQYMCHFK YGMVKTPWNLEPHKKAADVSPVKCN	32	ISL3 family transposase
Propionicin T1	Unclassified	<i>Propionibacterium thoenii</i>	VPGGCTYTRS NRDVIGTCKTGSGQFRILD CNNAPDKTSVWAKPKVMVSVHCLVGQPRSI SFETK	NS	
Reuterin 6	class II	<i>Lactobacillus reuteri</i> LA6	IYWIADQFGIHLATGTARKLLDAMASGASLG TAF AAILGVTLPAWALAAAGALGATAA	NS	
Rhamnosin A (fragmento)	Unclassified	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	AVPAVRKTNELD		
Sakacin G	Class IIa	<i>Lactobacillus sakei</i>	KYYGNGVSCNSHGCSVNWGQAWTCGVNH LANGGHGVC	NS	
Sakacin-A	class IIA/YGNGV	<i>Lactobacillus sakei</i>	ARSYNGVYCNKKCWVNRGEATQSIIGG MISGWASGLAGM	-	-
Sakacin-P (Sakacin 674)	class IIA/YGNGV	<i>Lactobacillus sakei</i>	KYYGNGVHCGKHSCTVDWGTAIGNIGNNA AANWATGGNAGWNK	NS	
Serracin-P (N- terminal amino acid sequence of the 43- kDa serracin P subunit)	Phage-Tail-Like	<i>Serratia plymuthica</i>	DYHHGVRVL		
Sublancin 168	Lantibiotic	<i>Bacillus subtilis</i>	GLGKAQCAALWLQCASGGTIGCGGGAVAC QNYRQFCR	-	-
Subtilosin	Unclassified	<i>Bacillus subtilis</i>	MKLPVQQVYSVYGGKDLPKGHSHTMPFL SKLQFLTKIYLLDIHTQPFFI	NS	
Subtilosin-A	Unclassified	<i>Bacillus subtilis</i>	NKGCATCSIGAACLVDGPIPDFEAGATGLF GLWG	-	-
Thermophilin 13	Unclassified	<i>Streptococcus thermophilus</i>	QINWGSVVGHCIGGAIIGGAFSGGAAAGVG CLVGS GKAIINGL	NS	

Thermophilin A	Unclassified	<i>Streptococcus thermophilus</i>	GALWGAPAGGVGALPGAFVGAHVGAIAAGG FACMGGMIGNKFN	61,1	hypothetical protein
Thuricin-S (secuencia parcial)	Unclassified	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>subsp. entomocidus</i>	DWTXWSXLVXAACSVELL	NS	
Ubericin A	Class IIa	<i>Streptococcus uberis</i>	KTVNYGNGLYCNQKKCWVNWSETATTIVN NSIMNGLTGGNAGWHS GGRA	NS	
Uberolysin	Unclassified	<i>Streptococcus uberis</i> <i>strain 42</i>	LAGYTGIASGTAKKVVDAIDKGAAAFVISIIS TVISAGALGAVSASADFIILT VKNYISRNLKAQ AVIW	-	-
UviB	Unclassified	<i>Clostridium perfringens</i>	ILFSYLLFYVLKENS KREDKYQNIIEELTELLP KIKEDVEDIKEKLNK	NS	
Variacin	Lantibiotic, Type A	<i>Micrococcus varians</i>	GSGVIPTISHECHMNSFQFVFTCCS	61,1	hypothetical protein
Weissellin A	Class IIa	<i>Weissella paramesenteroides</i> DX	KNYGNGVYCNKHKCSVDWATFSANIANN S VAMAGLTGGNAGNK	NS	

NS: no significativo.

11.2. Anexo 2. Parámetros estructurales de la secuencia de bacteriocina encontrada en el genoma de *L. reuteri* a través del programa EMBOSS Pepstats.

15/3/22, 11:53 https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/emboss_pepstats/result/emboss_pepstats-l20220315-145353-0164-49549010-p2m/out

PEPSTATS of EMBOSS_001 from 1 to 23

Molecular weight = 2683.25 Residues = 23
 Average Residue Weight = 116.663 Charge = 5.0
 Isoelectric Point = 11.0157
 A280 Molar Extinction Coefficients = 12490 (reduced) 12490 (cystine bridges)
 A280 Extinction Coefficients 1mg/ml = 4.655 (reduced) 4.655 (cystine bridges)
 Probability of expression in inclusion bodies = 0.864

Residue	Number	Mole%	DayhoffStat
A = Ala	3	13.043	1.517
B = Asx	0	0.000	0.000
C = Cys	0	0.000	0.000
D = Asp	0	0.000	0.000
E = Glu	0	0.000	0.000
F = Phe	1	4.348	1.208
G = Gly	2	8.696	1.035
H = His	0	0.000	0.000
I = Ile	1	4.348	0.966
J = ---	0	0.000	0.000
K = Lys	5	21.739	3.294
L = Leu	2	8.696	1.175
M = Met	1	4.348	2.558
N = Asn	0	0.000	0.000
O = ---	0	0.000	0.000
P = Pro	0	0.000	0.000
Q = Gln	2	8.696	2.230
R = Arg	0	0.000	0.000
S = Ser	1	4.348	0.621
T = Thr	1	4.348	0.713
U = ---	0	0.000	0.000
V = Val	1	4.348	0.659
W = Trp	2	8.696	6.689
X = Xaa	0	0.000	0.000
Y = Tyr	1	4.348	1.279
Z = Glx	0	0.000	0.000

Property	Residues	Number	Mole%
Tiny	(A+C+G+S+T)	7	30.435
Small	(A+B+C+D+G+N+P+S+T+V)	8	34.783
Aliphatic	(A+I+L+V)	7	30.435
Aromatic	(F+H+W+Y)	4	17.391
Non-polar	(A+C+F+G+I+L+M+P+V+W+Y)	14	60.870
Polar	(D+E+H+K+N+Q+R+S+T+Z)	9	39.130
Charged	(B+D+E+H+K+R+Z)	5	21.739
Basic	(H+K+R)	5	21.739
Acidic	(B+D+E+Z)	0	0.000

11.3. Anexo 3. Certificado de inscripción de proyecto PRIODO.



CARTA – CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRI-ODO

Santiago, 24 de agosto de 2021

Mat.: Asigna Código DIFO: 2021/14

Dr. Claudia Lefimil Puente

Investigadora Responsable PRI-ODO 2021/14
 Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
 Facultad de Odontología

PRESENTE

Estimada Dra. Lefimil:

Informo a usted que con fecha 24 de agosto de 2021, el Proyecto PRI-ODO, titulado: "Comunicación Mediante Quorum Sensing en Microorganismos Orales", del cual usted es la Investigadora Responsable, ha quedado inscrito en la DIFO con el **Código DIFO PRI-ODO 2021/14**, autorizándose su ejecución.

Este Proyecto cuenta con:

1. Carta Director de Departamento – IR.	SI	NO	N/A
2. Certificado de Aprobación del Comité de Ética de la FOUCh	SI	NO	N/A
3. Certificado de Aprobación del Comité de Bioseguridad	SI	NO	N/A

A partir de la Fecha de Registro del Proyecto, usted debe considerar el periodo de duración de 2 años, por lo tanto:

Fecha de Entrega Informe Final:	24 de agosto de 2023.
---------------------------------	-----------------------

Deseándole el mayor de los éxitos, se despide cordialmente,



DR. ALFREDO MOLINA BERRÍOS
 Director de Investigación
 Facultad de Odontología - Universidad de Chile

AMB/rcm.