



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ**



**FACULTAD DE MEDICINA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

Evaluación del efecto antifúngico del *Streptococcus
dentisani* sobre el crecimiento de biopelículas de
Candida spp. Estudio in vitro

TESIS QUE PRESENTA
M.E. JUAN GERARDO SÁNCHEZ MEDINA

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

Director de Tesis

Dra. Ma Saray Aranda Romo

Asesores

Dr. Mauricio Comas García

Dra. Rita Elizabeth Martínez Martínez

29 de Noviembre de 2022



Evaluación del efecto antifúngico del
Streptococcus dentisani sobre el
crecimiento de biopelículas de *Candida*
spp. Estudio in vitro por Juan Gerardo
Sánchez Medina se distribuye bajo una
Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional.

CREDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, bajo la tutoría de la Dra. Ma Saray Aranda Romo, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca con número 777099. Para la realización de este trabajo se utilizaron recursos provenientes del Fondo de Apoyo a la Investigación de la UASLP: FAI 2020 C20-FAI-10-04-04 y FAI 2020 C20-FAI-10-12-12. Adicionalmente se utilizaron recursos propios del Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología de la Facultad de Estomatología. Agradecer al Instituto de Física de la UASLP, las atenciones brindadas para trabajar en sus instalaciones.

Tesis que presenta:

M. E. JUAN GERARDO SÁNCHEZ MEDINA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ma Saray Aranda Romo

JURADO

Presidente de sinodales: Dra. Leticia Yañez Estrada

Secretario sinodal: Dr. Mauricio Comas García

Sinodal: Dra. Rita Elizabeth Martínez Martínez

29 Noviembre de 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS



Evaluación del efecto antifúngico del *Streptococcus
dentisani* sobre el crecimiento de biopelículas de
Candida spp. Estudio in vitro

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

PRESENTA

M.E. JUAN GERARDO SÁNCHEZ MEDINA

Director de Tesis

Dra. Ma Saray Aranda Romo

Asesor

Dr. Mauricio Comas García

Asesor

Dra. Rita Elizabeth Martínez Martínez

Evaluación del efecto antifúngico del *Streptococcus dentisani* sobre el crecimiento de biopelículas de *Candida spp.* Estudio *in vitro*

Sánchez-Medina JG^{1,2}, Comas-García M², Martínez-Martínez RE¹, Aranda-Romo S^{1,2}

¹Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

Autor de correspondencia:

Aranda-Romo Saray

Facultad de Estomatología

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Av. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria

San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

C.P. 78290

Tel (444) 826 2300 Ext. 5137

email.: sarayaranda@fest.uaslp.mx

RESUMEN

Antecedentes: Las bacterias probióticas inhiben la agregación, la formación de biopelículas y el dimorfismo de *Candida spp.* Sin embargo, se desconoce el efecto de un nuevo probiótico: *Streptococcus dentisani*, sobre el crecimiento de biopelículas de *Candida spp.* **Objetivo:** Determinar el efecto inhibitorio (antifúngico) de *S. dentisani* sobre las diferentes fases del desarrollo de la biopelícula de *Candida spp.* **Métodos:** Se realizó la cuantificación del crecimiento y los análisis ultraestructurales en biopelículas de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001, y de aislados de candidiasis oral (CA-C1), caries (CA-CR1) y de bolsa periodontal (CA-P1) tratados con suspensiones celulares, y sobrenadantes de *S. dentisani* CECT 7746. La viabilidad celular se determinó mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) y para los sobrenadantes el ensayo de reducción de sales de tetrazolio (XTT). **Resultados:** *S. dentisani* indujo una reducción significativa ($p < 0,05$) de las UFC de la biopelícula inmadura (27- 40 %) y de la madura (21- 28 %) en todas las cepas de *Candida spp.* Los sobrenadantes de *S. dentisani* inhibieron significativamente el desarrollo de las biopelículas de *C. glabrata* y CA-C1, la biopelícula inmadura de *C. albicans* ATCC y *C. glabrata*, y biopelícula madura de *C. albicans* ATCC, pero el efecto inhibitorio fue menor que el efecto directo. Los análisis microscópicos revelaron que *S. dentisani* redujo la densidad de *Candida* en una biopelícula mixta. La interacción hongo-bacteria afectó la integridad de la membrana celular en la levadura. **Conclusión:** Nuestros datos dilucidaron por primera vez, el efecto antifúngico de *S. dentisani*, en el desarrollo de biopelículas de *Candida spp.*, apoyando así, su utilidad como probiótico de nicho específico, para prevenir y tratar la disbiosis oral.

INTRODUCCIÓN

Candida spp., tiene interacción con bacterias en las biopelículas orales. En microambientes pro-inflamatorios y de estrés oxidativo de la cavidad oral estas interacciones pueden favorecer el paso de *C. albicans* de comensal a patógeno y asociarse a enfermedades orales entre las cuales se encuentran candidiasis, caries y enfermedad periodontal.^(1, 2) Las biopelículas multi-especies son difíciles de remover y resistentes a medicamentos, por lo que es necesario desarrollar terapias seguras y económicas para prevenir y tratar estas disbiosis orales basadas en, la modulación del crecimiento de las biopelículas de hongos y bacterias en equilibrio. El efecto de diferentes especies probióticas de *Lactobacillus*, así como de sus sobrenadantes sobre la inhibición de *Candida albicans* fue evaluado por Matsubara *et al.* los cuales encontraron una reducción significativa en la cuantificación de la biopelícula de *Candida albicans*.⁽³⁾ Otros estudios no han logrado demostrar un efecto en la inhibición de *Candida spp.* Martorano-Fernandes *et al.* evaluaron la interacción entre las biopelículas de *C. albicans* y *S. salivarius* bajo un microambiente similar a la periimplantitis (bajas concentraciones de oxígeno) encontrando que el crecimiento de *C. albicans* no cambió debido a la presencia del probiótico.⁽⁴⁾ Rossoni *et al.* aislaron cepas de *Lactobacillus* de sujetos sin caries y evaluaron los efectos inhibidores sobre *C. albicans* ATCC 18804. Encontraron que *L. paracasei* 30.1, 37.1 y 39.2, y *L. rhamnosus* 36.4 fueron las cepas que no tuvieron efectos inhibitorios.⁽⁵⁾ Esta variabilidad en los resultados obtenidos hasta la fecha del efecto antifúngico de las bacterias, puede deberse a que los probióticos evaluados fueron de un nicho no específico, sugiriendo que es necesario evaluar cepas probióticas específicas de cavidad oral.⁽⁶⁾ A la fecha no existen estudios que hayan evaluado el efecto de una bacteria probiótica específica de la superficie dental sobre aislados de *Candida spp.* provenientes de caries y bolsa periodontal. Un posible candidato por evaluar es el *Streptococcus dentisani*, fue descrito recientemente por Alex Mira y colaboradores como un probiótico prometedor ya que, además, de ser nicho específico cuenta con una acción anti-caries⁽⁷⁾ y parece tener un efecto en modular las biopelículas asociadas a enfermedad periodontal.⁽⁸⁾ En presencia de arginina, el *S. dentisani* tiene una capacidad amortiguadora de pH;

mantiene un pH salival neutral que favorece la homeostasis.⁽⁹⁾ A su vez la arginina es reconocida como un prebiótico oral; de manera *in vitro* reduce el crecimiento de *Candida spp.*⁽¹⁰⁾ El primer estudio para demostrar que *S. dentisani* tiene un efecto inhibitorio sobre *C. albicans* ATCC 14053, encontró que los sobrenadantes no inducen una inhibición total, pero si logran desacelerar el crecimiento, aunque estos resultados son alentadores recomiendan evaluar el efecto directo de las células probióticas sobre *Candida spp.* e incluir aislados clínicos ya que con estos podrían no encontrarse los mismos resultados; por tratarse de cepas con un fenotipo y genotipo diferente y por ende más resistentes.⁽¹¹⁾ Por lo anterior el objetivo de este estudio fue determinar el efecto inhibitorio de *S. dentisani* sobre diferentes fases del desarrollo de biopelículas de *Candida spp.*

MATERIALES Y METODOS

Diseño Experimental

Se estableció un diseño *in vitro*. Se siguieron los rasgos universales del diseño experimental: selección aleatoria de las unidades experimentales, número de repeticiones y control local de las condiciones. Con base a la fórmula Resource Equation basada en la ley de las repeticiones mínimas, se determinó una *n* de 1 unidad experimental por factor (tratamiento, cepa) en 6 experimentos independientes (repeticiones biológicas).⁽¹²⁾ El protocolo fue revisado y aprobado por unanimidad por el H. Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología, perteneciente a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. con folio de aprobación: CEI-FE-033-021.

Los ensayos se llevaron a cabo en dos fases de acuerdo con el protocolo previamente publicado por Matsubara et al.⁽³⁾ y se describen brevemente a continuación. En la primera etapa se evaluó el efecto directo de células probióticas plantónicas en el desarrollo de biopelículas de *Candida spp.* Se añadió una suspensión celular de *S. dentisani* 7746 a las biopelículas de *Candida spp.* en dos momentos de su formación: colonización inicial y maduración. La viabilidad celular se determinó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) en cada fase. En la segunda fase se evaluó el efecto de los productos bacterianos probióticos (exometabolitos); los sobrenadantes de *S. dentisani* 7746 en la

formación de la biopelícula de *Candida spp.*, los cuales se incubaron en diferentes intervalos de tiempo. La viabilidad celular de *Candida spp* se determinó mediante el ensayo de reducción de sal de tetrazolio (XTT). Finalmente, la morfología de las biopelículas de *Candida spp.* expuestas a *S. dentisani* se observaron bajo el microscopio de fuerza atómica y se compararon con la biopelícula control.

Microorganismos

Candida albicans ATCC 90028 (Robin, Berkhout, Iowa, EE. UU.), *Candida glabrata* ATCC 2001 (Anderson, Meyer), y aislados clínicos de *Candida albicans* obtenidos de candidiasis (CA-C1), bolsa periodontal (CA-P1) y caries (CA-CR1), la bacteria probiótica *Streptococcus dentisani* CECT 7746 (Camelo-Castillo et al, Valencia, España). Todas las cepas se almacenaron en glicerol al 20% a - 80 ° C antes de los experimentos.

Medios y condiciones de cultivo

Agar dextrosa Sabouraud (ADS; BD Bioxon) y Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS, BD Bioxon), se utilizaron para el cultivo de *Candida spp*. Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, BD Bioxon) se utilizó para el cultivo de *S. dentisani* y los cultivos de biopelículas mixtas de *Candida spp* y *S. dentisani*. Se obtuvo una solución de L-arginina (Green Labs Nutrition, EE. UU.) al 8% en agua destilada.

Candida spp y *S. dentisani* fueron inoculados en caldo CDS y BHI respectivamente, e incubados a 37°C por 24 h en un agitador orbital, en aerobiosis para ambos microorganismos. Las células fueron centrifugadas (2000x g por 5 min), lavadas dos veces con buffer fosfato salino (PBS; pH 7.2), y resuspendidas en BHI. Las suspensiones celulares de *Candida spp* y bacteria probiótica se ajustaron por espectrofotometría a una concentración de 1×10^7 células/mL. (*Candida* a 520nm: 0.375-0.385 A y *S. dentisani* a 600nm: 0.290 – 0.295 A).

Formación de biopelículas de *Candida spp.*

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, de poliestireno pre-esterilizado (Costar-Corning Incorporated, Nueva York, NY, EE. UU.) para el desarrollo de biopelículas de las cepas de *Candida spp.* En primer lugar 100 µL de una suspensión celular de *Candida spp.* (1×10^7 cel/ml) se transfirió a cada pocillo y se incubó por 1.5 h a 37°C. Después de la incubación se determinó la presencia de biopelícula a través de la prueba de adherencia al poliestireno. Cada pozo fue lavado dos veces con 200 µL de PBS para remover las células que no se adhirieron. 200 µL de BHI se transfirieron a cada pocillo por triplicado, y la microplaca se incubó a 37 ° C en los diferentes periodos de tiempo 7.5 y 25.5 h.

Ensayo de interacción entre hongos y células probióticas

S. dentisani se evaluó en las biopelículas formadas (7.5 y 25.5 h) por *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. albicans* de aislados clínicos de candidiasis (CA-C1), bolsa periodontal (CA-P1) y caries (CA-CR1). Se aspiraron los sobrenadantes de la biopelícula, se colocó 100 µL de BHI fresco y 100 µL de la suspensión celular de *S. dentisani* individualmente a los pocillos como tratamiento. Se usó BHI fresco como control en lugar de la suspensión probiótica. Las placas con 7.5 y 25.5 h de edad se incubaron adicionalmente hasta las 24 y 48 h, respectivamente, ambas a 37 ° C (Fig. 1). Después de la incubación final, los pocillos se lavaron dos veces con PBS. La biopelícula generada en cada pozo se transfirió a tubos Eppendorf con 1000µL de PBS, se realizaron diluciones hasta 1:1000. La viabilidad celular de *Candida spp.* se determinó mediante la siembra de la dilución 1:1000, por el método de microgotas en placas SDA ⁽¹³⁾ y una posterior cuantificación de UFC.

El efecto directo de *S. dentisani* más arginina al 8% se evaluó las biopelículas formadas (7.5 y 25.5 h) por *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. albicans* de aislados clínicos de candidiasis (CA-C1), bolsa periodontal (CA-P1) y caries (CA-CR1). Con la metodología descrita previamente.

Ensayo de sobrenadantes probióticos

Se evaluó el efecto de los sobrenadantes de *S. dentisani* sobre *Candida spp.* Los sobrenadantes probióticos se obtuvieron inoculando pozos de placas de seis pozos (Corning Incorporated, Nueva York, NY, EE. UU.) con 3 ml de una suspensión celular de *S. dentisani* a 1×10^7 células / mL en BHI, seguido de incubación aeróbica a 37 ° C por 1.5 h (fase 1), 24 h (fase 2) y 48 h (fase 3). Después de este periodo de incubación, se recogió el sobrenadante. Los sobrenadantes libres de células se obtuvieron mediante centrifugación seguida de filtración a través de un filtro de membrana 0,2 μm (Life Sciences, Ann Arbor, MI, EE. UU.). Se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso. Se desarrollaron biopelículas en diferentes tiempos adhesión (T 1), colonización inicial (T 2), y maduración (T 3) (Fig. 2). Posteriormente, se aspiraron los sobrenadantes de la biopelícula, se añadieron 100 μL de BHI fresco y 100 μL de los sobrenadantes de las fases 1, 2 y 3 como tratamiento. Se usó BHI fresco como control en lugar de la suspensión probiótica. Las placas con las biopelículas se incubaron durante 1.5 h, 18 h y 24 h más, respectivamente, a 37 ° C. Después de la incubación final, los pocillos se trataron con un ensayo de reducción de XTT estándar para medir la actividad metabólica (viabilidad celular) de las biopelículas y poder hacer un análisis cuantitativo. Lectura realizada con Multiskan FC® Microplate Photometer, Thermo Scientific.

Finalmente se evaluó el efecto de los sobrenadantes de *S. dentisani* más arginina sobre *Candida spp.* Se realizó el mismo procedimiento que para la etapa anterior, añadiendo en los pozos 20 μL de la solución al 8% de arginina.

Escaneo por microscopía de fuerza atómica

Se obtuvo una biopelícula de *C. albicans* ATCC 90028 y una de *S. dentisani* CECT 7746 en la fase de maduración (48 horas), para evaluarlas de manera individual y contar con un control. Además, se obtuvo una biopelícula mixta de hongo-bacteria en la fase de maduración (48 horas), la cual correspondería a el tratamiento probiótico. Lo anterior fue confirmado bajo el microscopio óptico y una tinción Gram. 6 μL de las suspensiones fueron colocadas en el porta-muestra del microscopio, se

dejó desecar y se fijó con polietilenimina al 1% durante 10 minutos. La observación de los especímenes se realizó en el Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, con un microscopio de fuerza atómica (AFM Multimode 8-HR /Nanoscope Controller V, Bruker, EE. UU.) en modo contacto.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en 6 experimentos independientes. Los resultados obtenidos se expresaron como media y desviación estándar. Debido a la distribución paramétrica de los datos se realizó un ANOVA de una vía para comparaciones múltiples de los grupos y la prueba *t* de Student para comparar los grupos de tratamiento y controles. Todos los análisis se realizaron mediante el software GraphPad Prism 9.0.1 (San Diego, CA, EU). Se consideró significativa la $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de la suspensión celular de *S. dentisani* en la formación de la biopelícula de *Candida spp.*

La suspensión celular de *S. dentisani* inhibe la formación de la biopelícula en estadios iniciales de la colonización y la maduración de la biopelícula de *Candida spp.* reduciendo significativamente ($p < 0,05$) los conteos de UFC de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001 y aislados clínicos de *C. albicans* CA-CR1, CA-C1 a las 24 y 48 h (Fig. 3) No se obtuvo un efecto significativo ($p > 0,05$) en el conteo de UFC del aislado clínico *C. albicans* CA-P1 a las 24 h, pero si disminuyó el conteo de UFC a las 48 h ($p < 0.05$), esta cepa fue menos susceptible a la actividad inhibidora del probiótico.

Por otro lado, utilizamos una mayor densidad de suspensión probiótica 2×10^7 cel/mL y encontramos una reducción significativa ($p < 0,05$) de los niveles de UFC en todas las cepas *Candida spp.* a las 24 y 48 h. (Fig. 4)

Se comparó el efecto de ambas suspensiones celulares probióticas con respecto porcentaje de reducción de UFC de las cepas evaluadas. (Tabla 1) Se determinó que la suspensión celular 2×10^7 cel/mL reduce un mayor porcentaje de las UFC en

la biopelícula de *Candida spp.* en comparación con la suspensión 1×10^7 cel/mL, sin embargo, al compararlas no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$)

El aislado clínico con el mayor y menor porcentaje en la reducción de UFC a las 24 h fue *C. albicans* CA-C1 y *C. albicans* CA-P1 respectivamente. ($p = 0.0038$) Para la biopelícula madura *C. albicans* ATCC 90028 fue la cepa más sensible al efecto antifúngico de *S. dentisani* y *C. glabrata* ATCC 2001 la más resistente. ($p = 0.0001$)

Efecto de la suspensión celular de *S. dentisani* más arginina en la formación de la biopelícula de *Candida spp.*

S. dentisani en combinación con arginina reduce significativamente ($p < 0,05$) los niveles de UFC de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* CA-CR1, CA-C1 tanto a intervalos de 24 como de 48 h. (Fig. 5) No se obtuvo un efecto significativo ($p > 0,05$) en el conteo de UFC de *C. glabrata* ATCC 2001 y *C. albicans* CA-P1 a las 48 h, solo en la fase de 24 h se obtuvo un efecto antifúngico significativo en ambos aislados. Lo anterior indica que *C. glabrata* ATCC 2001 y *C. albicans* CA-P1 son cepas menos susceptibles a la actividad inhibidora del sinbiótico, nombre que se le da a la combinación de probiótico y el prebiótico (*S.dentisani* + arginina) ⁽¹⁴⁾. Se obtuvieron los porcentajes de reducción de UFC de cada una de las cepas *Candida spp.* (Tabla 2), el mayor efecto antifúngico se observó en *C.glabrata* ATCC 2001 a las 24 h ($p = 0.0067$). y en la fase de las 48 h fue *C. albicans* CA- CR1 ($p = 0.0003$).

Efecto de los sobrenadantes de *S. dentisani* en el desarrollo de la biopelícula de *Candida spp.*

Los sobrenadantes del *S. dentisani* en sus diferentes fases de incubación, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la inhibición del desarrollo de la biopelícula de todas las cepas *Candida spp* utilizadas. (Fig. 6). En la T1 (fase de adhesión) de 1.5 h, solo *C. glabrata* ATCC 2001 y *C.albicans* CA-C1 mostraron diferencias significativas ($p < 0.007$) en la inhibición del desarrollo de la biopelícula: 18 % de reducción. En la fase T2 (fase de colonización) de 24 h, solo *C. glabrata* ATCC 2001 y *C. albicans* del CA-CR1 mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$): 15% y 36 % de reducción respectivamente. En la fase T3 (fase de maduración) de

48 h, solo *C. albicans* ATTC 90028 mostró diferencias significativas ($p < 0.0001$): 22 % de reducción.

Efecto de los sobrenadantes de *S. dentisani* más arginina en el desarrollo de la biopelícula de *Candida* spp.

Los sobrenadantes del *S. dentisani* en combinación con arginina, mostraron diferencias significativas ($p < 0.007$) en la inhibición del desarrollo de la biopelícula de 48 h de las cepas *Candida* spp. (Fig. 7). En la T1 (fase de adhesión) de 1.5 h, ninguna cepa *Candida* spp. mostró diferencias significativas en la inhibición del desarrollo de la biopelícula. En la fase T2 (fase de colonización) de 24 h, solo *C. glabrata* ATTC 2001 mostró diferencias significativas ($p < 0.007$). En la fase T3 (fase de maduración) de 48 h, todas las cepas de *Candida* spp. mostraron diferencias significativas ($p < 0.007$) en la inhibición del desarrollo de la biopelícula, a excepción del aislado de *C. albicans* ATCC 90028.

Efecto de la arginina en el desarrollo de la biopelícula de *Candida* spp.

Adicionalmente con la finalidad de evaluar el efecto de la arginina sobre las diferentes cepas de *Candida* spp. se colocó como tratamiento a las biopelículas de *Candida* spp arginina y se comparó con el desarrollo de biopelículas sin arginina. (Fig. 8). En el biofilm inmaduro de 24 h la arginina solo redujo significativamente ($p < 0.05$) los niveles de UFC en *C. albicans* CA-CR1. En una biopelícula madura de 48 h la arginina reduce significativamente ($p < 0.05$) los niveles de UFC en *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001, y todos los aislados clínicos de *C. albicans*.

Escaneado con microscopía de fuerza atómica

Bajo la observación del microscopio de fuerza atómica la biopelícula madura de *C. albicans* ATCC 90028 (Fig. 9 a) presentó un menor grado de desarrollo de hifas, se observó un predominio de levaduras, células ovaladas de entre 2-3 μm . El control de *S. dentisani* CECT 7746 (Fig. 9 b) presento la típica forma de cocos, asociados en cadenas y algunos diplococos. Células esféricas de entre 0.5 - 1.5 μm . La observación de la biopelícula mixta, la cual corresponde al tratamiento probiótico

presentó una arquitectura con una alta densidad de hifas. De manera aislada se observaron levaduras de dimensiones reducidas y cocos no asociados (Fig. 10 a). Dos hallazgos interesantes fueron la observación de varias levaduras con perforaciones en la membrana y estructuras con el patrón "mazorca de maíz", resultado de la asociación hongo-bacteria (Fig. 10 b). Las hifas presentes proporcionaron una superficie de adhesión y desarrollo a *S. dentisani*, este se presentó en mayor densidad en relación con *C. albicans*.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio *in vitro* que evalúa el efecto antifúngico del probiótico *S. dentisani* y sus sobrenadantes, sobre diferentes cepas de *Candida spp.* (ATCC y aislados clínicos), en diferentes etapas del desarrollo de la biopelícula. Se logró demostrar que el *S. dentisani* y sus sobrenadantes reducen los niveles de UFC de *Candida spp.* ($p < 0.05$), y la viabilidad celular respectivamente.

La suspensión celular de *S. dentisani* redujo significativamente las UFC en la mayoría las cepas de *Candida spp.*, durante las dos etapas de formación de la biopelícula. Esto se debe a la interacción sinérgica hongo-bacteria, promovida por el efecto directo del probiótico. El *Streptococcus* promueve la formación de hifas, superficies ricas en glucano a las que se adhiere; aprovechándolas como estructuras de andamiaje para su crecimiento y desarrollo. ⁽¹⁵⁾ Posteriormente, una vez que *S. dentisani* tiene un crecimiento denso se estarían obteniendo los beneficios que llevan a la muerte de *Candida spp.*: a través de una vía arginolítica *S. dentisani* regula el pH del microambiente, y produce péptidos que llevan a alteraciones en la membrana. ^(9, 10) Además se obtienen otros beneficios generados por la interacción sinérgica como: intercambio de metabolitos para comunicarse entre sí, ajuste en la densidad de población, cambios en patrones de expresión génica, etc. Estos datos no son comparables con estudios previos ya que a la fecha no existen estudios similares, sin embargo, existen estudios previos que han evaluado el efecto de los *Streptococcus* sobre el crecimiento de *Candida*: *Streptococcus thermophilus* (Azad A. *et al.*; 2021), mediante un modelo murino y métodos de cultivo e histopatológicos encontraron que la cepa probiótica tuvo una

actividad inhibidora frente al crecimiento de *C. albicans*, redujo significativamente las UFC.⁽¹⁶⁾ *Streptococcus salivarius* K12 (Mokhtar M. et al. ; 2021), a través de pruebas de coagregación y recuento total de células encontraron que el probiótico disminuye significativamente a *C. albicans* ATCC MYA-4901, aislado del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (ALC2) y aislado de cáncer oral (ALC3). También se observó inhibición de la transición de levadura a hifa ⁽¹⁷⁾ Por otro lado, Martorano-Fernandes *et al.* no encontraron un efecto antifúngico sobre *C. albicans* ATCC 90028 por el probiótico *Streptococcus salivarius* ATCC 7073. Esto se podría deber a que en este estudio ellos recrearon de manera *in vitro* condiciones similares a las de la enfermedad periimplantaria, los bajo niveles de oxígeno que utilizaban pudieron ser la causa. ⁽⁴⁾

S. dentisani no tuvo efecto antifúngico sobre el aislado de periodontitis a las 24 h, pero si a las 48 h; esto se podría deber al diseño del experimento, ya que a las 24 h ninguno de los aislados alcanzo su punto máximo de crecimiento. Si bien Matsubara *et al.* sí obtenían efecto antifúngico en ambos intervalos de tiempo; nuestros resultados se asocian a la especie probiótica con la que se trabajó, *Streptococcus* y no con *Lactobacillus*. Los *Streptococcus* alcanzan su máximo crecimiento entre las 24 y 48 h, mientras que los *Lactobacillus* lo hacen entre las 12 y 24 h. ^(3, 7)

La cepa más sensible al efecto directo de *S. dentisani* a las 24 h fue el aislado de candidiasis, seguida por la *C. albicans* ATCC 90028. En la biopelícula madura la cepa más sensible fue *C. albicans* ATCC 90028, esto se debe a que es una cepa prototipo, sin los factores de virulencia que circulan actualmente y además únicos en cada individuo. Estos resultados se comparan con los obtenidos por Matsubara *et al.* en donde si bien evaluaron un probiótico diferente (*Lactobacillus reuteri*), solo observaron una actividad probiótica significativa en la cepa ATCC. Nosotros además encontramos un efecto significativo en los aislados clínicos, lo atribuimos completamente a la especie probiótica con la que trabajamos. Si bien aún no hay evidencias sobre el efecto de *S. dentisani* sobre *Candida spp.* si la hay sobre *Streptococcus oralis*; especie filogenéticamente más cercana. ⁽⁷⁾ Diaz *et al.* encontraron que *C. albicans* y *S. oralis* muestran una interacción sinérgica. El

estreptococo oral que tiene un rol de comensal obtiene gran parte de los beneficios de esta interacción: tiene un aumento en la adherencia inicial, lo cual lleva a una mayor coagregación y presencia de *S. oralis* en una biopelícula mixta. Estos resultados sugirieron que *C. albicans* permite que los estreptococos se acumulen en biopelículas principalmente mediante la retención de células estreptocócicas a través de la interacción física directa. ⁽¹⁸⁾ Por otro lado el aislado clínico de periodontitis fue más resistente a *S. dentisani*, si bien, si hubo diferencia significativa en la biopelícula de 48 h, los porcentajes de reducción de UFC fueron bajos. Lo anterior se debe a los patrones de expresión génica y de adaptación de ese aislado. ⁽¹⁵⁾

En la biopelícula madura de 48 h se observó resistencia en las cepas *C. glabrata* ATCC 20001 y del aislado clínico de periodontitis En el primer se debe a la virulencia alcanzada por la biopelícula madura de *C. glabrata*: esta cepa se caracteriza por presentar una alta tasa de resistencia a las diferentes terapias antifúngicas actualmente disponibles. Algunos de los mecanismos conocidos son la sobreexpresión de transportadores, mutaciones en genes que alteran la termotolerancia, la generación de hipervirulencia por aumento de factores de adhesión y modificaciones en enzimas vitales que producen proteínas de la pared celular. *C. glabrata* tiene una mutación en el gen *ERG11*, este participa en la biosíntesis de ergosterol. La mutación de *ERG11*, vuelve más resistente a la membrana a posibles moléculas antifúngicas. ⁽¹⁹⁾ Además, podría estar involucrada a la ausencia de hifas en la biopelícula madura de *C. glabrata*; compuesto exclusivamente por células de levadura en una estructura multicapa. ⁽²⁰⁾ La hifa es una estructura necesaria para que *S. dentisani* establezca una interacción sinérgica. En el caso del aislado de periodontitis (CA-P1), lo adjudicamos al genotipo y fenotipo originado por las condiciones a las que se sometió a *C. albicans* en la bolsa periodontal, lugar de donde se tomó el asilado. ⁽¹⁵⁾

Un hallazgo interesante fue el del ensayo donde utilizamos una suspensión celular 2×10^7 cel/mL; una densidad celular relativamente alta de *Streptococcus* redujo significativamente ($p < 0.05$) la biopelícula (UFC) de *Candida spp.* Lo anterior implica

que la cantidad total de exometabolitos producidos por el probiótico puede ser crítica para el efecto antimicrobiano observado. ⁽³⁾ Notamos que los porcentajes de reducción de UFC no guardan cierta proporcionalidad entre la suspensión sin concentrar y la concentrada. La concentración ideal para administrar el *S. dentisani*, podría ser por encima de 1×10^7 células/mL, pero sin la necesidad de llegar al 2×10^7 cel/mL.

Al evaluar el efecto directo de *S. dentisani* más arginina se proporcionaron los beneficios probióticos y prebióticos; denominado como sinbiótico. En la biopelícula inmadura de 24 h de todas las cepas *Candida spp.* se observó una disminución significativa de las UFC. Esto se debe a que por un lado *S. dentisani* tuvo una interacción célula-célula con *C. albicans*, pero además se suma que la arginina mejora las condiciones para el crecimiento del probiótico. A través de una vía metabólica dependiente del aminoácido; la vía de la arginina desiminasa (ADS), se produce amoníaco. Este lleva a un aumento del pH citoplasmático, y en el microambiente, lo cual es competitivo contra los patógenos. ⁽⁹⁾

El aislado clínico de caries fue sensible al efecto sinbiótico de *S. dentisani* y arginina, esto se debe a que el probiótico es de nicho específico de la superficie dental ^(7,9) Es tentador especular que originamos las condiciones necesarias en el microambiente del pozo, al colocar elementos nativos de la superficie dental; probiótico, prebiótico y hongo comensal. Probablemente generamos una comunicación adecuada entre reinos: moléculas de señalización y/o metabolitos fueron liberados. Se liberaron autoinductores adecuados para modular el comportamiento celular dentro de la biopelícula mixta y promover el sinergismo. ⁽¹⁵⁾ Esto explicaría que durante los ensayos el aislado de caries tenía bajos porcentajes de reducción y fue con esta combinación que se obtuvieron mejores resultados. Podrían existir un efecto anti-caries sinérgico de este sinbiótico y la posibilidad de su uso terapéutico ante cándida, como participe en la etiología de la caries. Se requiere dilucidar mejor los mecanismos.

En cuanto a los sobrenadantes de *S. dentisani* los resultados fueron variables de acuerdo con las etapas de la formación de la biopelícula y la cepa, la mayor inhibición de la viabilidad celular se obtuvo en los estadios iniciales de la formación de la biopelícula. En la etapa de adhesión (1.5 h) de la formación de la biopelícula, los sobrenadantes inhibieron significativamente la viabilidad celular de *C. glabrata* ATCC 2001. Se debe a que es una cepa ATCC, con pocos factores de virulencia y se compara con los resultados obtenidos por Llena *et al.*, en donde si bien utilizaron una cepa ATCC diferente; también encontraron que los sobrenadantes reducen la viabilidad celular del hongo. ⁽¹¹⁾ Algunos de los aislados clínicos presentaron una reducción significativa en la viabilidad celular: en la etapa de adhesión (1.5 h) fue el aislado de candidiasis y en la etapa de colonización (24 h) el aislado de caries, esto es congruente con nuestros resultados anteriores, en donde al parecer estos aislados son menos virulentos y resistentes al *S. dentisani*.

Finalmente, en la etapa de maduración (48 h) únicamente se redujo la viabilidad celular de *C. albicans* ATCC 90028, resultado que esperábamos por lo reportado por Llena *et al.*, en el mismo periodo de incubación. Con esto queda claro que los sobrenadantes no son muy efectivos sobre aislados clínicos. Si bien los sobrenadantes del estreptococo no inducen una inhibición total, si logran desacelerar el crecimiento de *Candida spp.* ⁽¹¹⁾

El efecto de los sobrenadantes más la arginina redujo la viabilidad celular de la mayoría de las cepas de *Candida spp* en la etapa de maduración, y en la etapa de adhesión ninguna cepa mostró reducción de la viabilidad celular, esto se debe a que la arginina es la que está generando el efecto antifúngico en el pozo tal y como lo reportaron Koopman *et al.* a través de la regulación del pH. ⁽¹⁰⁾

Adicionalmente se evaluó el efecto antifúngico de la arginina: aminoácido que tiene aplicaciones en la prevención y el tratamiento de las enfermedades orales. ⁽²¹⁾ Su efecto fue evaluado sobre la biopelícula madura e inmadura, encontramos que su efecto antifúngico es alcanzado hasta las 48 h y es significativo en todas las cepas *Candida spp.* Estos resultados son consistentes y se explican por lo reportando en la literatura por Koopman JE. *et al.*, ellos generaron un modelo de biopelícula de "boca artificial" en placas múltiples, cultivaron microcosmos durante 4 semanas con

arginina al 1,6 % (p/v). suplemento (Arginina) o sin (Control), si bien utilizaron una metodología diferente que incluía en la etapa final a la q-PCR y no el conteo de UFC, se concluía que la arginina suprime el crecimiento del patógeno oportunista *Candida spp.* a través del pH básico que promueve en el microambiente, esto puede ser estresante para *Candida spp.* causando que el biofilm sea menos competitivo.⁽¹⁰⁾ Otros estudios han evaluado el efecto de la arginina sobre *Candida spp.* de manera *in vitro*, todos encontraron una inhibición en el desarrollo sobre la biopelícula. Sugieren mecanismo de acción que involucran modificaciones en el pH del microambiente, alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular y daño mitocondrial, lo que lleva a la muerte por apoptosis de *Candida spp.*^(22, 23) Nuestros hallazgos y los de otros autores dejan en claro que es necesaria la promoción de la arginina como antifúngico.

La formación de hifas o de filamentos es un paso esencial en patogenia de la *Candida spp.*⁽¹⁹⁾ El análisis estructural que realizamos a través del AFM nos demostró que la biopelícula mixta hongo-bacteria, establece una interacción primeramente sinérgica, que en determinado momento se vuelve antagónica. Las interacciones metabólicas entre *Candida spp.* y estreptococos, llevan a la expresión de hifas, las cuales son superficies estructurales y de adhesión. Las hifas presentan adhesinas como: ALS (Agglutinin-Like Sequence), Hwp1 (Hyphal Wall Protein 1) e Iff/Hyr (Hyphally Regulated Protein 1) las cuales permiten la adhesión y desarrollo de los estreptococos. Se forman las estructuras con el patrón "mazorca de maíz", así, el probiótico tiene más superficies para su crecimiento hasta alcanzar su curva máxima y con ello una mayor densidad con relación a la levadura y en este punto la interacción se vuelve antagónica un mayor crecimiento de la bacteria inhibe el subsecuente desarrollo de la levadura posiblemente evitando la formación de filamentos.⁽¹⁵⁾ Esto explicaría la presencia de pocas levaduras, así como de las alteraciones en esta célula. Probablemente también estarían involucradas las bacteriocinas que produce el *S. dentisani*; Conrads *et al.* tipificaron las bacteriocinas producidas por *S. dentisani* identificaron 11 posibles genes de bacteriocinas las cuales pertenecen a la Clase II b. Esta clase de bacteriocinas son formadoras de poros en la membrana celular y que coincide con nuestras observaciones.⁽²⁵⁾ Lo

observado a través del AFM nos permitió comprender un poco la interacción directa hongo-bacteria.

Dentro de las fortalezas del estudio se logró hacer una caracterización del efecto directo e indirecto del probiótico *S. dentisani*. Además, por los tiempos de incubación 24 h y 48 h, y 1.5 en el caso de los sobrenadantes; evaluamos las diferentes etapas de la biopelícula de *Candida spp.*, lo cual sienta las bases para futuros estudios en modelos murinos, así como ensayos clínicos para establecer la aplicación del *S. dentisani* como agente preventivo y/o terapéutico.

El haber trabajado bajo los rasgos universales del diseño experimental hace a nuestros datos más confiables; se podrían usar en aproximaciones para el cálculo de una *n* en un estudio *in vivo* de la misma índole. El usar biopelículas mixtas de *Candida spp.* y algunas bacterias patógenas dentro de la cavidad oral, podría haber enriquecido nuestros resultados.

Como perspectiva se plantea el desarrollar la biopelícula sobre superficies como esmalte, fibroblastos y/o con diferentes concentraciones de oxígeno, humedad, pH, etc., nos permitiría acercarnos más a la realidad de lo que ocurre dentro de la cavidad oral. Además, se pretende explicar mediante técnicas moleculares los mecanismos por los cuales se lleva a cabo el efecto antifúngico del *S. dentisani* y sus exometabolitos y la interacción hongo-bacteria.

CONCLUSIÓN

Los hallazgos del presente estudio dilucidan por primera vez, el efecto antifúngico de *S. dentisani*, en el desarrollo las biopelículas de *Candida spp.* El efecto podría atribuirse tanto a las interacciones directas de célula – célula y a la producción de exometabolitos que desestabilizan la organización y arquitectura de la biopelícula de *Candida spp.* Nuestro estudio también reveló que *S. dentisani* inhiben el desarrollo de *Candida spp.* en las diferentes fases de desarrollo de la biopelícula. Lo anterior apoya el uso del *S. dentisani* como probiótico de nicho específico, para prevenir y tratar la disbiosis oral; asociada a caries, candidiasis y periodontitis. Se requieren estudios en modelos animales.

REFERENCIAS

- 1.- d'Enfert, C., Kaune, A. K., Alaban, L. R., et al (2021). The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS microbiology reviews*. 45: fuaa060.
- 2.- Diaz, P.I., Dongari-Bagtzoglou A. (2021) Critically Appraising the Significance of the Oral Mycobiome. *J Dent Res*. 100(2):133-140.
- 3.- Matsubara, V. H. (2016) Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biopelícula development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Applied microbiology and biotechnology*.100(14).
- 4.- Martorano-Fernandes L, Rodrigues NC, de Souza Borges MH, et al (2020). Interkingdom interaction between *C. albicans* and *S. salivarius* on titanium surfaces. *BMC Oral Health*.1;20(1):349.
- 5.- Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, et al (2018). Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*. 34(2):212-225.
- 6.- Zaura E, Twetman S, (2019). Critical Appraisal of Oral Pre- and Probiotics for Caries Prevention and Care. *Caries Res*. 53:514-526.
- 7.- Camelo-Castillo A., Benítez-Páez A., Belda-Ferre P., et al. (2014) *A. Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64: 60–65.
- 8.- Esteban-Fernández A, Ferrer MD, Zorraquín-Peña I, et al. (2019) In vitro beneficial effects of *Streptococcus dentisani* as potential oral probiotic for periodontal diseases. *J Periodontol*. 90(11):1346-1355.
- 9.- López-López, A., Camelo-Castillo, A., Ferrer, M. D. et al. (2017) Health-Associated Niche Inhabitants as Oral Probiotics: The Case of *Streptococcus dentisani*. *Frontiers in microbiology*; 379.
- 10.- Koopman JE, Röling WF, Buijs MJ, et al. (2015) Stability and resilience of oral microcosms toward acidification and *Candida* outgrowth by arginine supplementation. *Microb Ecol*. 69(2):422-33.

11.- Llana C, Almarche A, Mira A, et al. (2019) Antimicrobial efficacy of the supernatant of *Streptococcus dentisani* against microorganisms implicated in root canal infections. *J Oral Sci.* 61(1):184-194

12.- Mead R. (2012) Cambridge University Press -Statistical Principles for the Design of Experiments. https://assets.cambridge.org/97805218/62141/frontmatter/9780521862141_frontmatter.pdf . Acceso 08 October 2021

13.- Thomas P, Sekhar AC, Upreti R, et al. (2015) Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnol Rep.* 2015; 20:45-55.

14.- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015) Probiotics, prebiotics and synbiotics - a review. *Journal of food science and technology.* 52(12): 7577–7587.

15.- Xu H, Jenkinson HF, Dongari-Bagtzoglou A. (2014) Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus-Candida* interactions in oral health and disease. *Mol Oral Microbiol.* 29(3):99-116.

16.- Azad A, Ranjbaran A, Zareshahrabadi Z, et al. (2021) Protective Effects of the Probiotic Bacterium *Streptococcus thermophilus* on *Candida albicans* Morphogenesis and a Murine Model of Oral Candidiasis. *Iran J Med Sci.* 46(3):207-217.

17.- Mokhtar M, Rismayuddin NAR, Mat Yassim AS, et al. (2021) *Streptococcus salivarius* K12 inhibits *Candida albicans* aggregation, biofilm formation and dimorphism. *Biofouling.* 37(7):767-776.

18.- Diaz PI, Xie Z, Sobue T, et al. (2012) Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect Immun.* 80(2):620-32.

19.- Frías-De-León MG, Hernández-Castro R, Conde-Cuevas E, et al. (2021) *Candida glabrata* Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic Combination. *Pharmaceutics.* 22;13(10):1529.

20.- Cavalheiro M, Teixeira MC. (2018) *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front Med (Lausanne).* 13; 5:28.

21.- Nascimento MM. (2018) Potential Uses of Arginine in Dentistry. *Adv Dent Res.* 29(1):98-103.

22.- Taniguchi M, Ochiai A, Takahashi K, et al. (2016) Effect of alanine, leucine, and arginine substitution on antimicrobial activity against candida albicans and action mechanism of a cationic octadecapeptide derived from α -amylase of rice. *Biopolymers.* 106(2):219-229.

23.- Serpa Sampaio Moreno L, Nobre Junior HV, Ramos da Silva A, et al. (2021) Arginine-phenylalanine and arginine-tryptophan-based surfactants as new biocompatible antifungal agents and their synergistic effect with Amphotericin B against fluconazole-resistant Candida strains. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 207:112017.

24.- Conrads G, Westenberger J, Lürkens M, et al. (2019) Isolation and Bacteriocin-Related Typing of Streptococcus dentisani. *Front Cell Infect Microbiol.* 16; 9:110.

Evaluación del efecto antifúngico del *Streptococcus dentisani* sobre el crecimiento de biopelículas de *Candida spp.* Estudio *in vitro*.

Tablas y Figuras

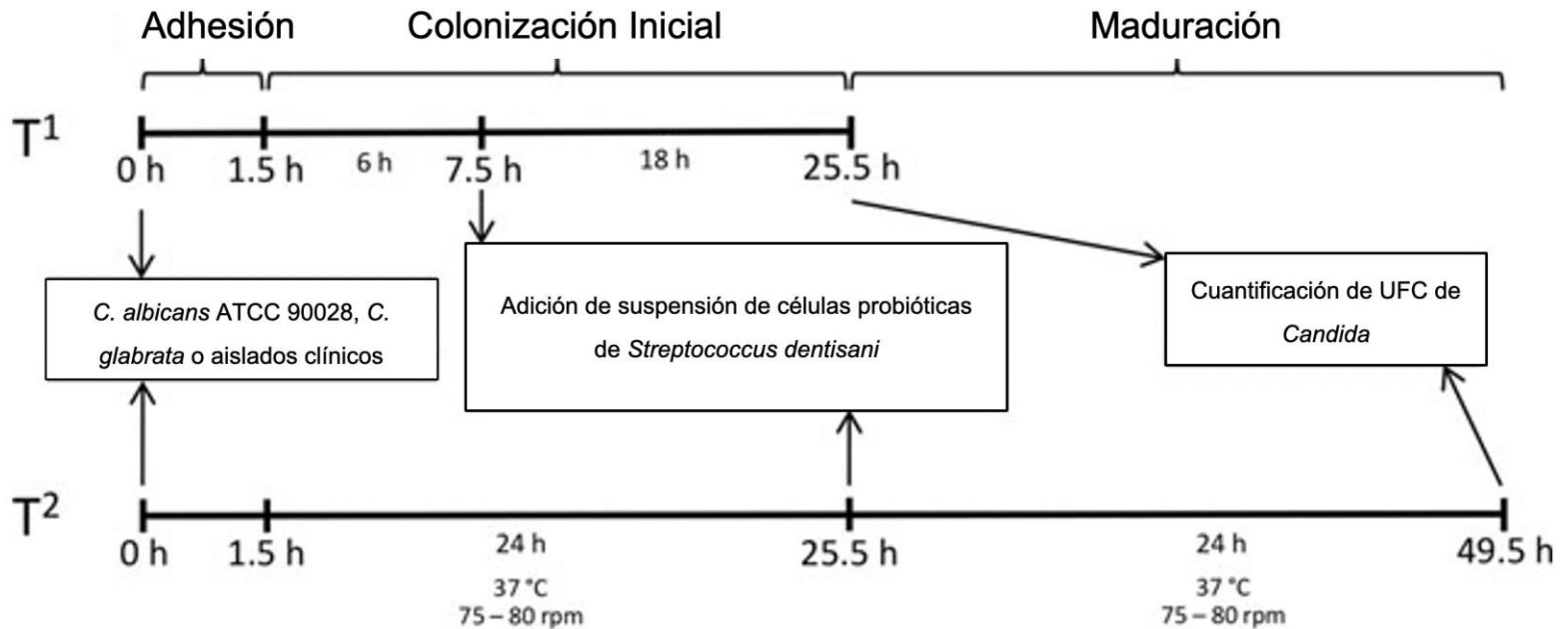


Figura 1.- Ensayo con suspensión celular probiótica: el diagrama muestra las diferentes fases de la biopelícula de *Candida* spp. en la parte superior, a las 0 h se incubo *Candida* spp. , posteriormente se añade la suspensión probiótica a las 7.5 o 25.5 h según la fase que se quería evaluar (T) y finalmente se retiraba de incubacion para la siembra y conteo de UFC.

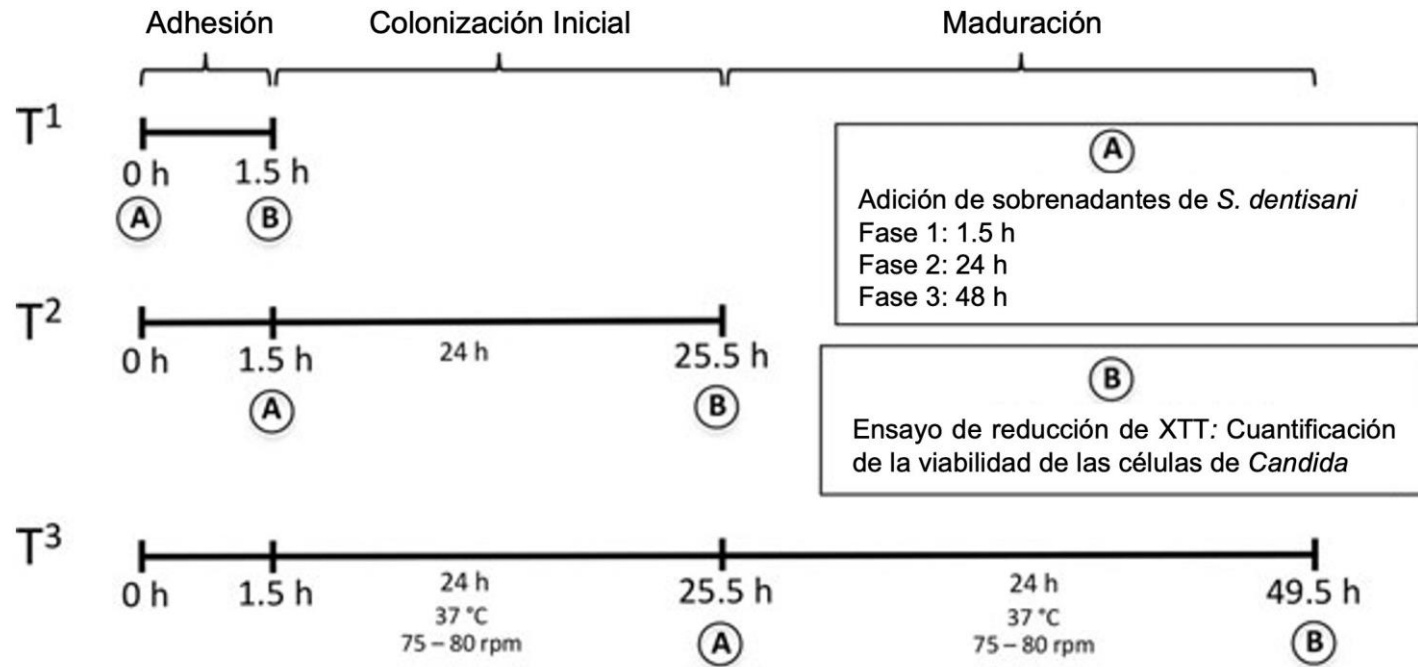


Figura 2.- Ensayo con sobrenadantes probióticos: el diagrama muestra las diferentes fases de la biopelícula de *Candida* spp. en la parte superior, a las 0 h se incubó *Candida* spp. , posteriormente se añadían los sobrenadantes como lo indica A , en los tiempos 0 , 1.5 y 25.5 h según la fase que se quería evaluar (T) y finalmente se evalúa la viabilidad celular B.

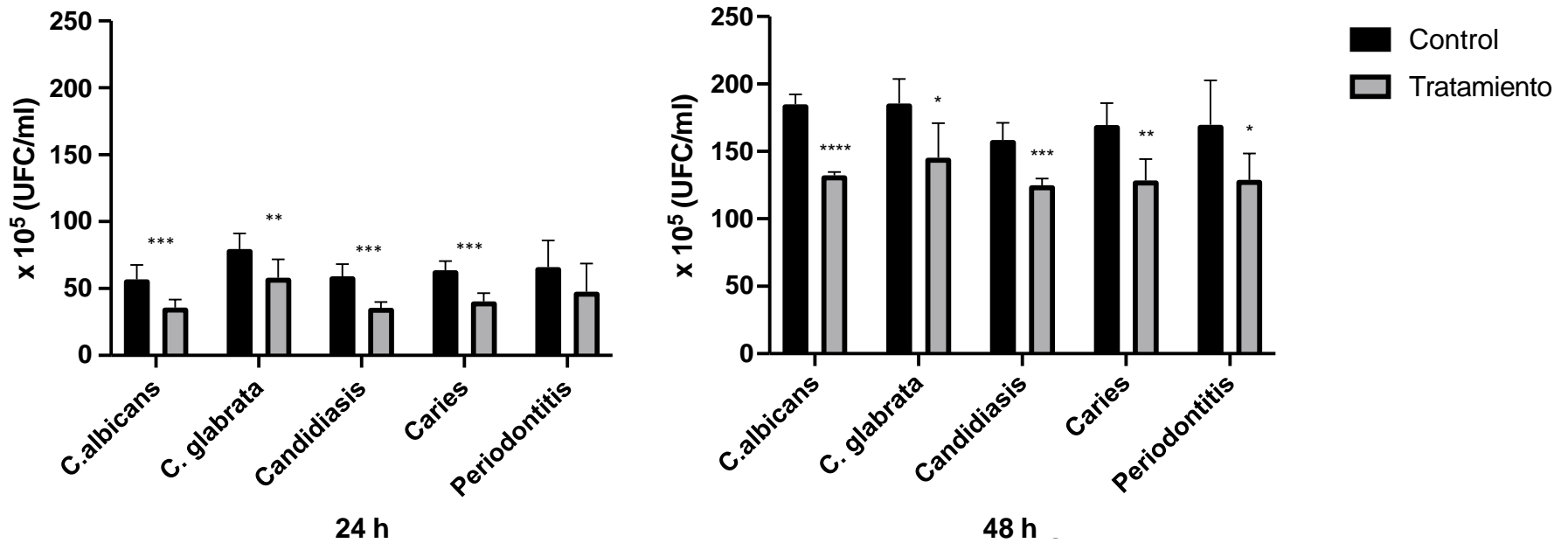


Figura 3.- Efecto directo de células probióticas *S. dentisani* en biopelículas de 24 h y 48 h de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001 y aislados clínicos de *C. albicans* (candidiasis, caries y periodontitis). Los datos se presentan como media \pm DE (n = 6). t- student * p < 0.05, ** p < 0.008, *** p < 0.002, **** p < 0.0001.

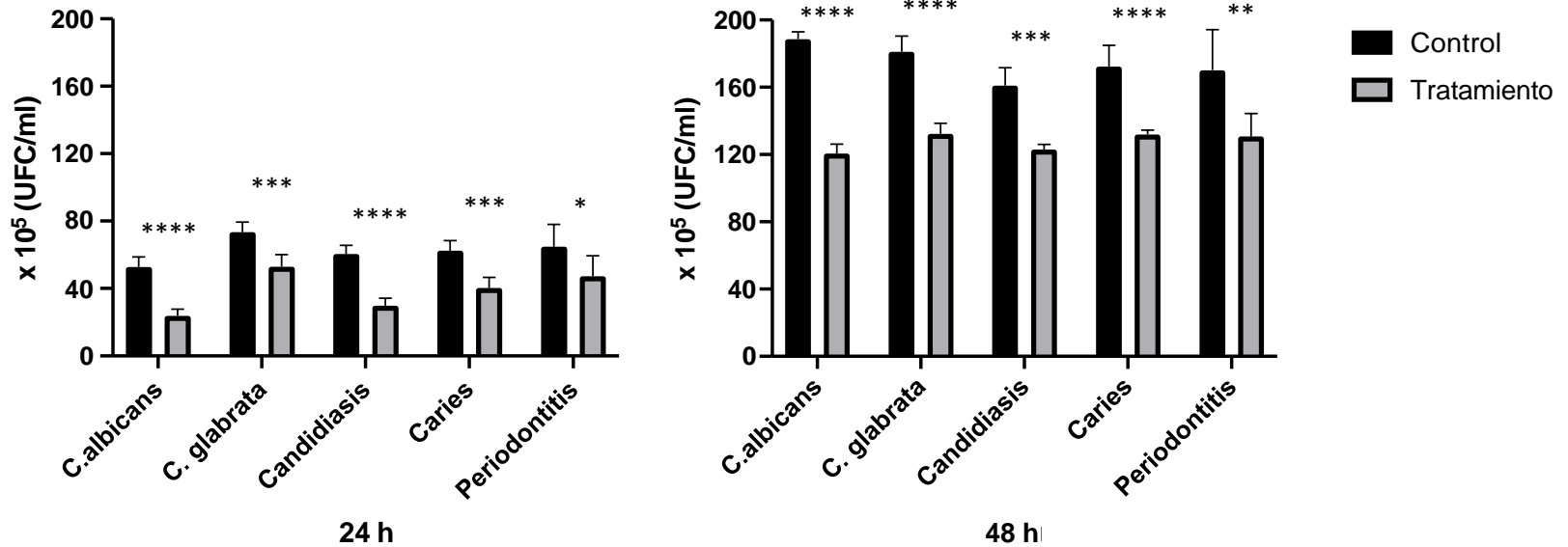


Figura 4.- Efecto directo de células probióticas *S. dentisani* concentrado (2×10^7 cel/mL) en biopelículas de 24 h y 48 h de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001 y aislados clínicos de *C. albicans* (candidiasis, caries y periodontitis). Los datos se presentan como media \pm DE (n = 6). t- student * p < 0.05, ** p < 0.008, *** p < 0.002, **** p < 0.0001.

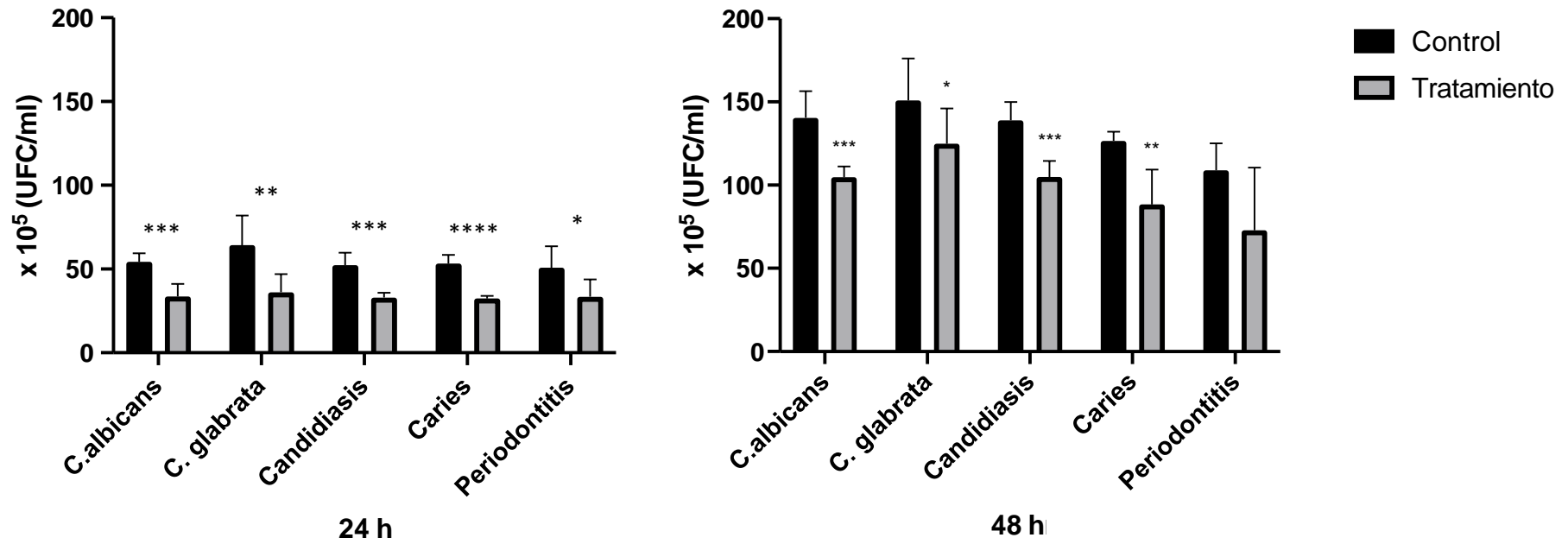


Figura 5.- Efecto directo de células probióticas *S. dentisani* y arginina en biopelículas de 24 h y 48 h de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001 y aislados clínicos de *C. albicans* (candidiasis, caries y periodontitis). Los datos se presentan como media \pm DE (n = 6). t- student * p < 0.05, ** p < 0.008, *** p < 0.002, **** p < 0.0001 .

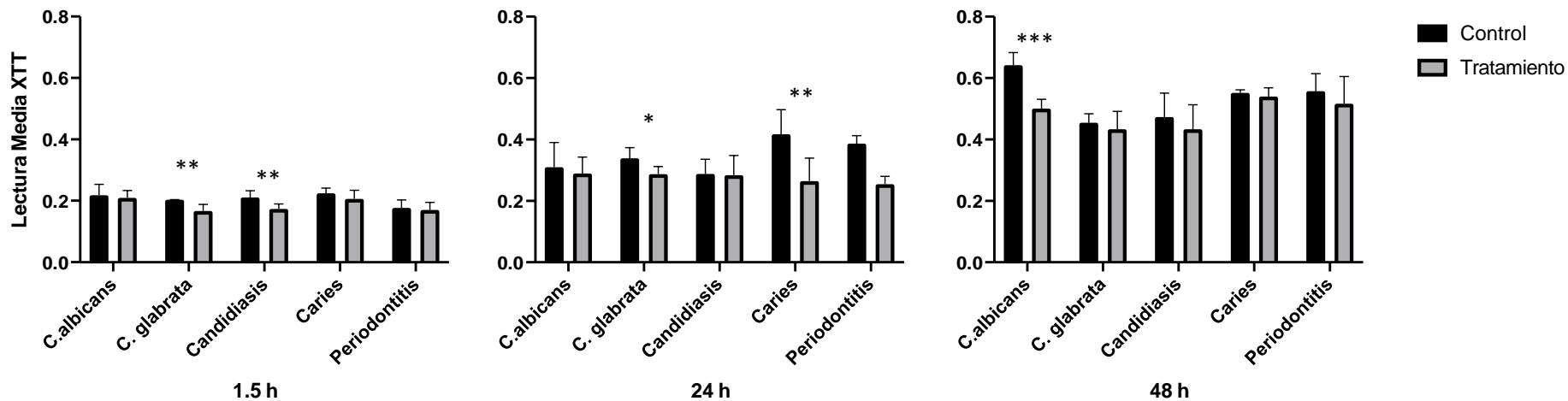


Figura 6.- Efecto indirecto de *S. dentisani* (sobrenadantes) sobre biopelículas de 1.5 h (Fase 1), 24 h (Fase 2) y 48 h. (Fase 3) de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001 y aislados clínicos de *C. albicans* (candidiasis, caries y periodontitis). Los datos se presentan como media \pm DE (n = 6). t- student * p < 0.05, ** p < 0.007, *** p < 0.0001.

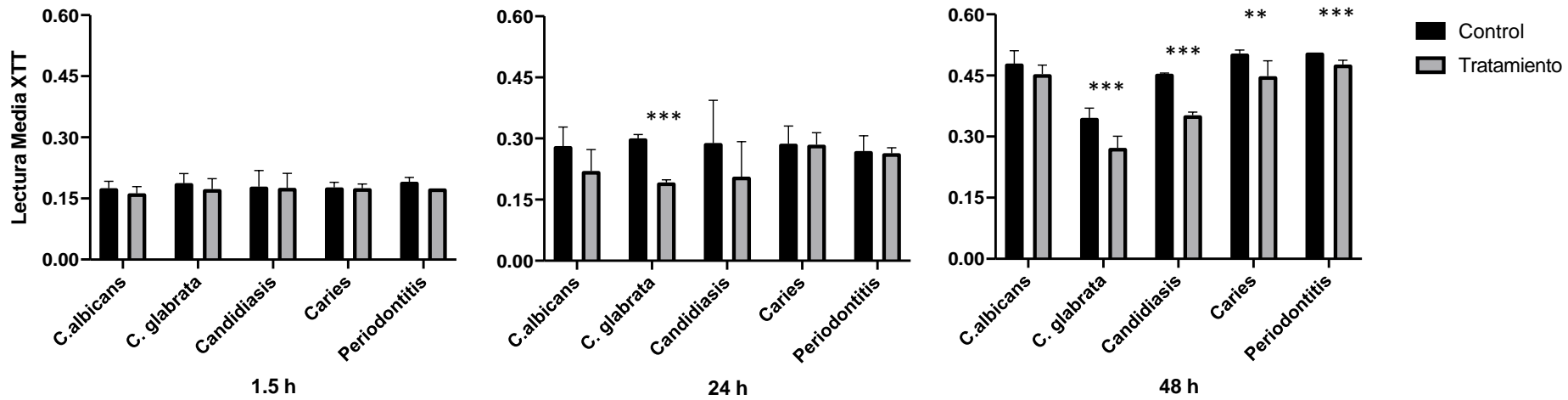


Figura 7.- Efecto indirecto *S. dentisani* (sobrenadantes) de y arginina sobre biopelículas de 1.5 hrs (Fase 1), 24 hrs (Fase 2) y 48 hrs. (Fase 3) de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001 y aislados clínicos de *C. albicans* (candidiasis, caries y periodontitis). Los datos se presentan como media \pm DE (n = 6). t- student ** p < 0.007, *** p < 0.0001.

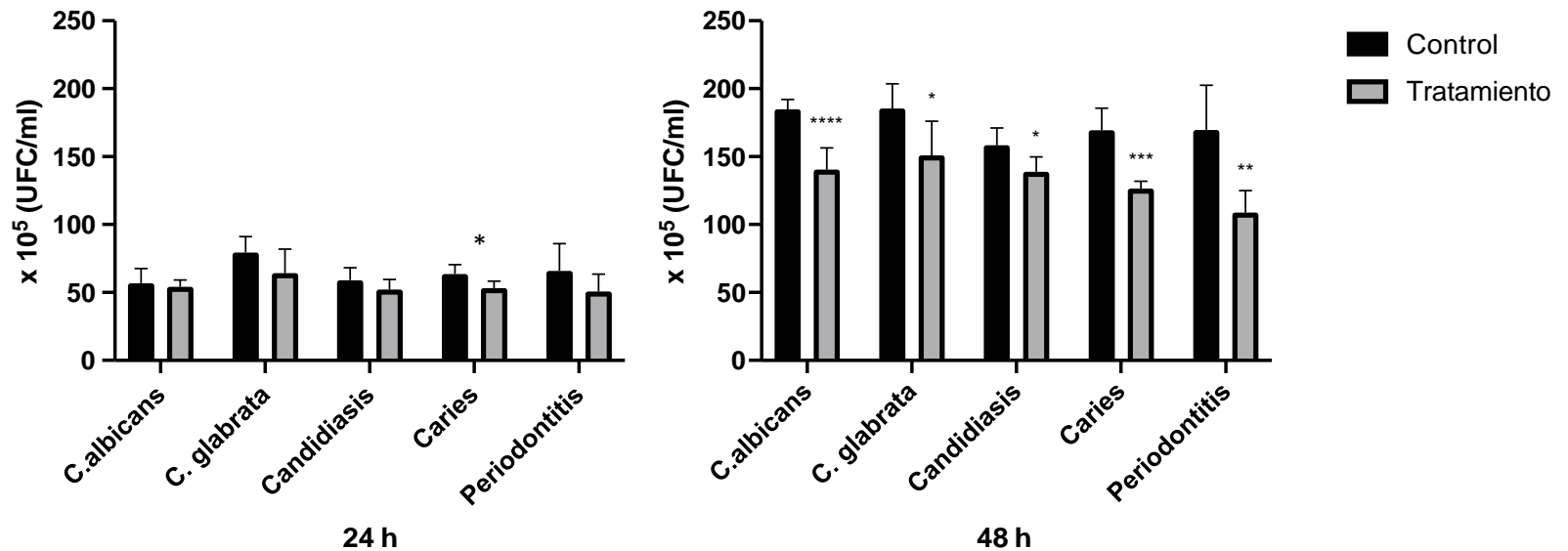


Figura 8.- Efecto directo de arginina sobre biopelículas de 24 h y 48 h de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001 y aislados clínicos de *C. albicans* (candidiasis, caries y periodontitis). Los datos se presentan como media \pm DE (n = 6). t- student * p < 0.05, ** p < 0.008, *** p < 0.002, **** p < 0.0001 .

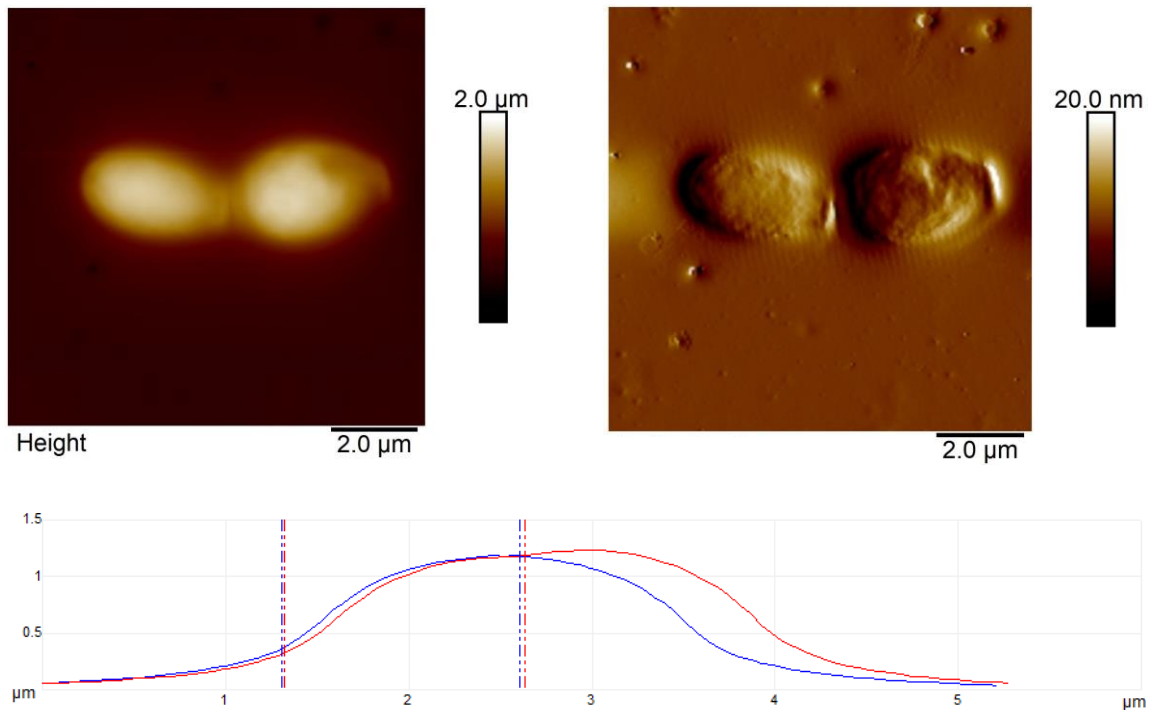


Figura 9 .- a Visualización de *Candida albicans* ATCC 90028 en la fase de biopelícula madura de 48 h. Levaduras:células ovaladas de entre 1-2 μm.

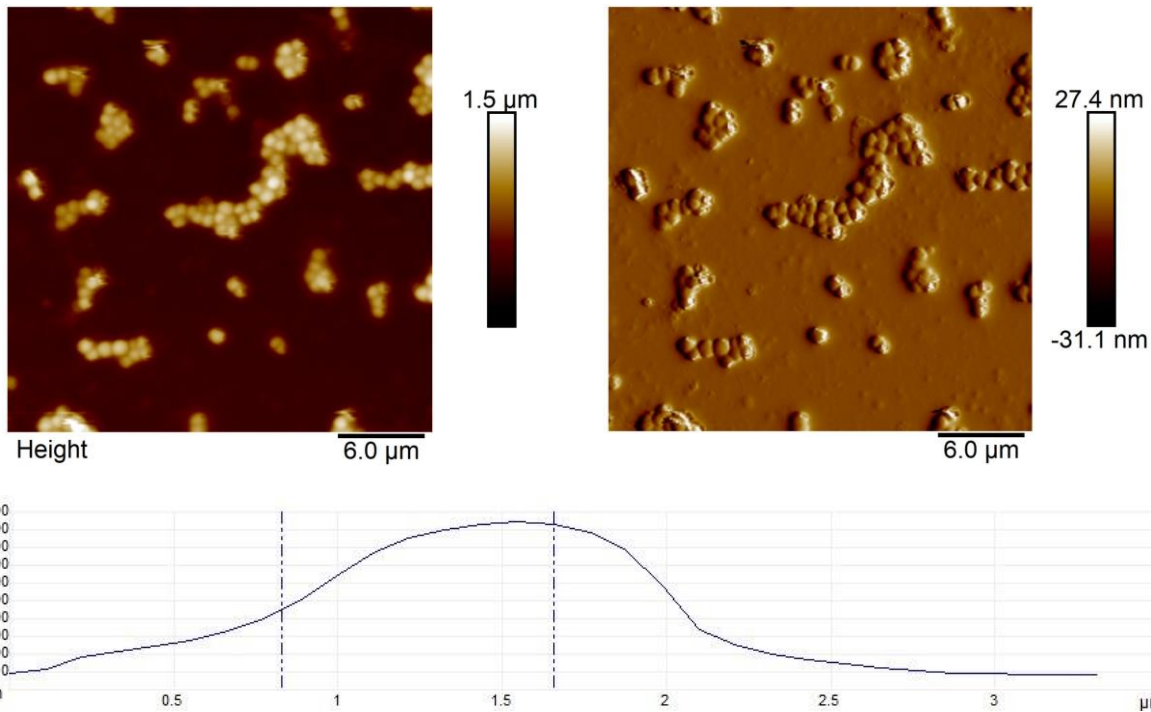


Figura 9.- b Visualización de *Streptococcus dentisani* CECT 7746 en la fase de biopelícula madura 48 h. Se observa la típica forma de cocos, asociados en cadenas y algunos diplococos. Células esféricas de entre 0.5 - 1 μm .

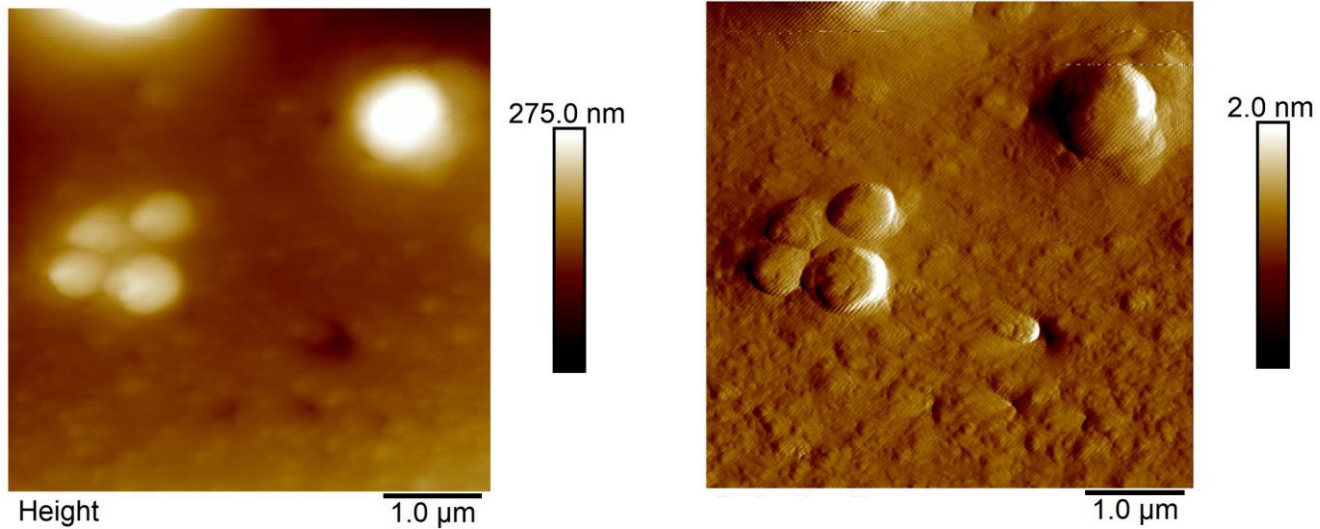


Figura 10.- a Visualización de biopelícula multiespecie *C. albicans* + *S. dentisani* en la fase de biopelícula madura de 48 h. Se observaron levaduras de dimensiones reducidas.

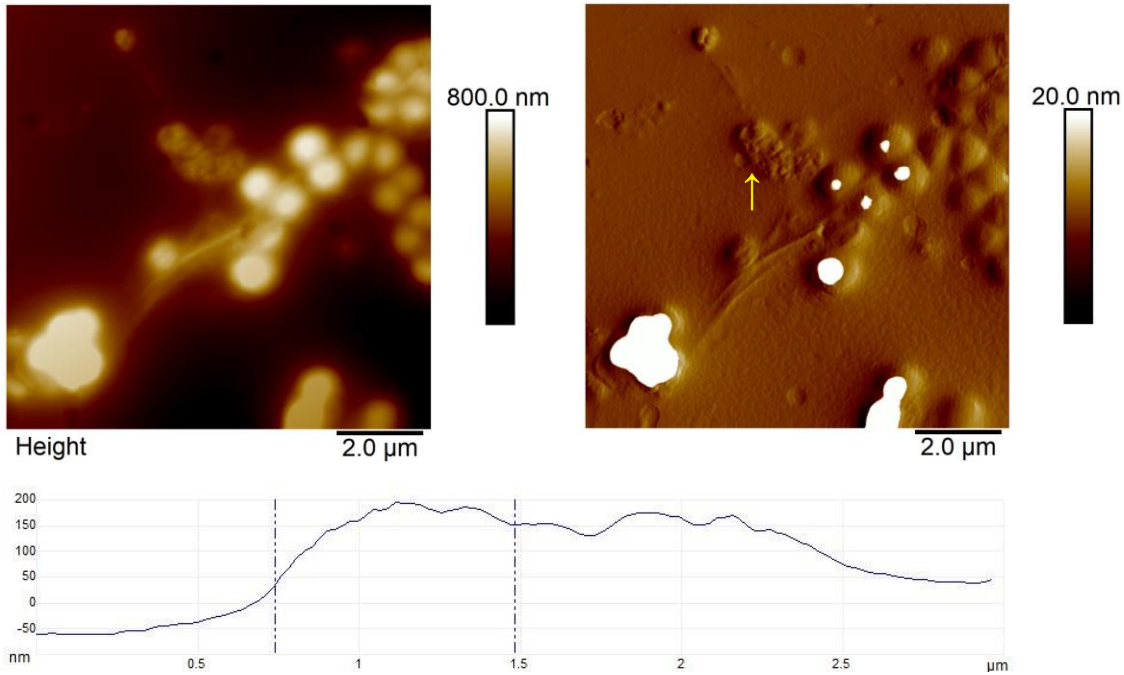


Figura 10.- b Visualización de biopelícula multiespecie *C. albicans* + *S. dentisani* en la fase de biopelícula madura de 48 h. Se observó una asociación de los MO: las hifas de *Candida* proporcionan superficies para la adhesión y crecimiento de cocos. Se observan levaduras con perforaciones en la membrana ↑.

Tabla 1.- Reducción de UFC de *Candida spp.* según la concentración de *S. dentisani* a las 24 h y 48 h. * \bar{x} (n = 6) , \emptyset p > 0.05 t- student

Cepa	Suspensión celular						
	<i>S. dentisani</i> (1x10 ⁷ cel/mL)			<i>S. dentisani</i> 2x (2x10 ⁷ cel/mL)			
	UFC control*	UFC Tratamiento*	Reducción	UFC control*	UFC Tratamiento*	Reducción	
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	57	36	37 %	53	24	55 %	24 h
<i>C.glabrata</i> ATCC 2001	79	58	27%	73	53	28 %	
<i>C.albicans</i> candidiasis CA-C1	59	35	40%	60	30	51 %	
<i>C.albicans</i> caries CA-CR1	64	40	37%	62	40	35 %	
<i>C.albicans</i> periodontitis CA-P1	66	48	28% \emptyset	65	47	27%	
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	185	133	28%	188	121	36 %	48 h
<i>C.glabrata</i> ATCC 2001	186	145	22%	181	132	27 %	
<i>C.albicans</i> candidiasis CA-C1	158	125	21%	161	123	24 %	
<i>C.albicans</i> caries CA-CR1	170	129	24%	172	132	23 %	
<i>C.albicans</i> periodontitis CA-P1	170	129	24%	170	131	23 %	

Tabla 2.- Reducción de UFC de *Candida spp.* según la concentración de *S. dentisani* más arginina a las 24 h y 48 h. * \bar{x} (n = 6) , \emptyset p > 0.05 t- student

Suspensión celular más arginina				
Cepa	<i>S. dentisani</i> (1x10 ⁷ cel/mL)			
	UFC control*	UFC tratamiento*	Reducción	
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	54	34	38 %	24 h
<i>C.glabrata</i> ATCC 2001	64	36	44%	
<i>C.albicans</i> candidiasis CA-C1	52	33	37%	
<i>C.albicans</i> caries CA-CR1	53	32	39%	
<i>C.albicans</i> periodontitis CA-P1	51	33	34%	
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	140	105	25%	48 h
<i>C.glabrata</i> ATCC 2001	151	125	17% \emptyset	
<i>C.albicans</i> candidiasis CA-C1	139	105	24%	
<i>C.albicans</i> caries CA-CR1	127	88	30%	
<i>C.albicans</i> periodontitis CA-P1	109	73	33% \emptyset	