

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 172**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2020** **PCT/EP2020/086413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021** **WO21122741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2020** **E 20839248 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024** **EP 4076390**

54 Título: **Tratamiento prebiótico y probiótico para reducir la disbiosis bucal y promover la eubiosis**

30 Prioridad:

17.12.2019 EP 19383131
11.06.2020 EP 20179452

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2024

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA EL FOMENTO DE LA
INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMEDICA DE
LA COMUNITAT VALENCIANA (100.0%)**
Avda. Catalunya, 21
46020 Valencia, ES

72 Inventor/es:

MIRA OBRADOR, ALEJANDRO;
ROSIER, BOB THADDEUS;
FERRER GARCÍA, MARÍA DESAMPARADOS y
LÓPEZ LÓPEZ, ARÁNZAZU

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 979 172 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento prebiótico y probiótico para reducir la disbiosis bucal y promover la eubiosis

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los campos de la medicina, del cuidado bucal y de la microbiología y, particularmente, a las composiciones que comprenden nitrato y/o bacterias probióticas para reducir la disbiosis bucal y promover la eubiosis.

TÉCNICA ANTERIOR

10 *Disbiosis bucal/caries, enfermedades periodontales y halitosis/tratamientos actuales*

La microbiota bucal es conocida como una comunidad microbiana diversa con + de 100-200 especies bacterianas por individuo, de las + de 700 que se han identificado a nivel mundial en la cavidad bucal. La variación interindividual es resultado de las diferencias de edad, factores del huésped (p. ej., genéticos e inmunitarios), entorno y hábitos. La cavidad bucal ofrece varios hábitats distintos para la colonización microbiana y la formación de biopelículas, como los dientes, lengua, mucosa yugal (cara interna de las mejillas), labio, paladar y encía, y la proporción de especies en cada hábitat es significativamente diferente. La saliva se inocula con bacterias de todas las superficies bucales y, tras la eliminación de biopelículas (p. ej., higiene bucodental), las bacterias de la saliva empiezan a formar rápidamente nuevas biopelículas en la superficie limpiada.

En comparación con otras comunidades del cuerpo humano, la microbiota bucal se mantiene relativamente estable en adultos sanos a lo largo de períodos de años. A pesar de la estabilidad de la microbiota bucal, ésta es un ecosistema vivo y su composición y actividad pueden sufrir fluctuaciones. Ciertos desencadenantes de una enfermedad pueden provocar perturbaciones en las especies y funciones del microbioma bucal que pueden desencadenar el desarrollo de enfermedades bucales. Estas perturbaciones entre el huésped y el microbioma asociadas a enfermedades se conocen como disbiosis y están causadas por una variación en la composición y la actividad microbianas. La disbiosis puede estar causada por cambios fisiológicos que son resultado, p. ej., de la edad y de la disfunción de las glándulas salivales o de las adopciones de un estilo de vida, como la dieta, la mala higiene o el tabaquismo.

Durante muchos años, se consideró que había bacterias "patógenas" en la microbiota que causaban infecciones y enfermedades. Ahora, se sabe que las bacterias que se consideraban patógenas forman parte de la microbiota residente y están presentes en un estado saludable, aunque en menor número. Una enfermedad bucal se desarrolla debido a un cambio perjudicial en el equilibrio de la microbiota que da lugar a un aumento de la abundancia de las especies asociadas a una enfermedad, en lugar de ser el resultado de un patógeno exógeno que cause una infección. En la disbiosis, las bacterias asociadas a una enfermedad pueden crecer en mayor proporción que en condiciones saludables. De manera adicional, las bacterias pueden intercambiar de metabolismo y activar funciones que contribuyen a la disbiosis y al desarrollo de una enfermedad. Resumiendo, las perturbaciones pueden conducir a una enfermedad bucal cuando los desencadenantes de una enfermedad son lo suficientemente fuertes o persistentes.

La resiliencia es la capacidad de resistir o recuperarse frente a perturbaciones cuando los desencadenantes de una enfermedad están presentes y esta capacidad difiere entre los individuos susceptibles y

tolerantes. En la caries, p. ej., los principales desencadenantes de una enfermedad son los carbohidratos fermentables, como los azúcares. La microbiota bucal puede fermentar estos carbohidratos y convertirlos en ácidos orgánicos, principalmente en lactato, lo que causa una caída en el pH local. Con el tiempo, esto da lugar a una microbiota que es más tolerante a ácidos y más eficiente en la fermentación de carbohidratos, generando un ciclo de retroalimentación positiva que puede causar desmineralización del esmalte si los niveles de pH bajan por debajo de un pH ~5,5. Ciertas especies están asociadas al estado disbiótico de la placa dental supragingival que se observa en la caries, incluyendo representantes resistentes a ácidos de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Oribacterium*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, y ciertas levaduras. Notablemente, otras especies asociadas a la salud disminuyen en número a medida que se desarrolla la enfermedad de la caries, incluyendo *Neisseria* spp., *Rothia* spp. y *Kingella* spp.

En las enfermedades periodontales, el principal desencadenante de una enfermedad es una activación inmunitaria innata del huésped por la placa dental acumulada (es decir, biopelículas en las superficies de los dientes), debido a la falta de higiene bucodental. En este caso, también existe un ciclo de retroalimentación positiva que puede alterar la microbiota y conducir a las enfermedades periodontales. En este ciclo, la acumulación de placa causa un aumento de las condiciones anaeróbicas y, posteriormente, un crecimiento de las especies anaeróbicas. De manera adicional, el huésped responde a las bacterias acumuladas con una inflamación gingival que selecciona especies tolerantes a la inflamación. La inflamación también da lugar a un ligero aumento de la temperatura y a una mayor fuga de líquido crevicular gingival (LCG, es decir, un líquido similar al suero que sale del surco gingival). El LCG contiene una gran cantidad de proteínas de suero e, involuntariamente, sirve de nutrición para las especies proteolíticas. La degradación de las proteínas, da lugar a un pH neutro o ligeramente alcalino, estimulando el crecimiento de especies alcalófilas.

Las enfermedades periodontales comienzan con inflamación bacteriana, inducida por biopelículas, de los tejidos blandos que rodean los dientes (es decir, gingivitis). La placa dental aparece en diferentes tonos de blanco y se combina con restos de alimentos que normalmente se encuentran en el margen gingival que bordea los dientes. La biopelícula también se encuentra habitualmente entre los dientes, donde su eliminación requiere esfuerzos adicionales mediante el uso, p. ej., de hilo dental y cepillos interproximales. La higiene bucodental regular es necesaria para prevenir la inflamación, ya que la abstención de higiene bucodental da lugar a la gingivitis sin excepciones, generalmente tras un período de 2-3 semanas. Los episodios repetidos o duraderos de gingivitis pueden dar lugar a periodontitis, que es una inflamación crónica y destructiva en la que se pierde tejido del huésped.

La microbiota de la placa subgingival disbiótica asociada a la periodontitis es compleja. Las bacterias clásicas asociadas a la periodontitis (es decir, consistentemente más abundantes en la enfermedad) incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sin embargo, en una reciente revisión sistemática, otras 17 especies se asociaron a la enfermedad, incluyendo (otras) especies de los géneros *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Dialister*, *Peptostreptococcus*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Prevotella* (Perez-Chaparro et al., 2014). Notablemente, también en el desarrollo de la enfermedad periodontal, se

reducen o pierden especies asociadas a la salud, y entre éstas se incluyen representantes de *Neisseria*, *Rothia*, o *Kingella*, entre otros. Con respecto a esto, *Neisseria* y *Rothia* se correlacionan con mediadores antiinflamatorios, lo que indica que estas especies previenen la inflamación perjudicial. En el caso de periimplantitis, que consiste en una afección patológica que ocurre en los tejidos alrededor de los implantes dentales, se ha descubierto que la microbiología asociada es extremadamente similar a la de la periodontitis, y también se considera que es el resultado de una disbiosis microbiana, lo que conduce a una fuerte inflamación de la mucosa periimplantaria y a la pérdida progresiva del hueso de soporte.

El mal aliento, también conocido como halitosis, es un síntoma en el que se presenta un aliento fuerte notoriamente desagradable. La halitosis es intraoral en el 90 % de los casos y está causada principalmente por cambios en la composición y la actividad de la microbiota lingual, lo que conduce a una disbiosis microbiana. Este estado disbiótico causa la degradación bacteriana de los aminoácidos que contienen azufre, lo que da lugar a la producción de compuestos sulfúricos volátiles (CSVs), tales como sulfuro de hidrógeno (H₂S), metilmercaptano y, en menor medida, dimetilsulfuro. Aparte de la microbiota lingual, la halitosis también se ha asociado a la periodontitis y las bolsas periodontales pueden ser una fuente de formación de CSV. No obstante, la mayoría de los individuos con halitosis no padecen periodontitis y su recubrimiento lingual es la única fuente de CSVs. Diferentes estudios con diferentes métodos de detección han identificado una amplia gama de bacterias asociadas a la producción de CSV y a la halitosis. Algunas bacterias que se han asociado sistemáticamente con el estado disbiótico de la microbiota lingual son representantes de *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* y *Leptotrichia*, y el clásico biomarcador de halitosis *Solobacterium moorei*. Resulta interesante que, *S. moorei* también se ha asociado a la periodontitis. Al igual que para la caries y las enfermedades periodontales, existen algunas especies asociadas a la salud que podrían prevenir la halitosis, incluyendo *Rothia* spp. y *Neisseria* spp. La afección de la halitosis tiene un significativo impacto personal y social en quienes la padecen y se estima que es el tercer motivo más frecuente de búsqueda de ayuda dental, seguido de la caries y la enfermedad periodontal.

De manera destacable, las comunidades bacterianas asociadas a la salud y asociadas a una enfermedad difieren entre las diferentes superficies y su(s) correspondiente(s) enfermedad(es). No obstante, se puede encontrar cierto solapamiento entre las diferentes enfermedades. Por ejemplo, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* están asociadas a la inflamación en la periodontitis, pero también a la producción de CSVs en la halitosis. Notablemente, dos géneros bucales asociados sistemáticamente con la salud son *Rothia* y *Neisseria*. Los representantes de estos géneros son sistemáticamente más abundantes en la salud que en la enfermedad y disminuyen a medida que la enfermedad se desarrolla, independientemente de la superficie. Esto es relevante desde el punto de vista de la caries, la gingivitis, la periodontitis, la periimplantitis y la halitosis. Un tercer género es *Kingella* que se asocia a la salud dental y periodontal. Un aumento de estos tres géneros de reducción de nitrato puede considerarse como una eubiosis de las biopelículas bucales, lo que hace referencia a una composición de microbiota con mayores niveles de bacterias beneficiosas.

El tratamiento periodontal implica normalmente la eliminación física de la biopelícula y tiene como resultado la reducción de la inflamación y la mejora de la afección periodontal general. Modalidades de tratamiento adicionales incluyen desbridamiento quirúrgico, uso de tetraciclina o aplicación local de agentes estatínicos, o

prescripción de antibióticos sistémicos. También se suelen usar enjuagues orales antibacterianos, tales como gluconato de clorhexidina, triclosán, triclosán más citrato de zinc o flúor. Tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a los patógenos bucales y, por lo tanto, los colutorios se usan para tratar diferentes enfermedades bucales (p. ej., enfermedades periodontales, caries y halitosis). Sin embargo, estos compuestos antimicrobianos tienen diferentes efectos secundarios relevantes tales como irritación y daño de la mucosa bucal, decoloración y manchado de los dientes, alteración de la percepción del gusto, alteración endocrina o resistencia a antibióticos.

Precisamente, uno de los efectos indeseables más relevantes de los antisépticos está asociado a las alteraciones causadas en la microbiota bucal como consecuencia de su efecto antiséptico no selectivo. Notablemente, la microbiota bucal contribuye a los niveles de óxido nítrico sistémico mediante la reducción de nitrato a nitrito. Se ha demostrado que un colutorio antiséptico aumenta la presión arterial al alterar la reducción de nitrato por parte de las bacterias bucales. De manera adicional, la ingesta de nitrato en la dieta estimula la reducción de nitrato por parte de la microbiota bucal, lo que tiene varios efectos beneficiosos, incluyendo la disminución de la presión arterial, el aumento del rendimiento deportivo y los efectos antidiabéticos. A la luz de esto, se ha demostrado que un colutorio antiséptico interfiere en el rendimiento deportivo. De manera adicional, el colutorio de venta sin receta médica se correlaciona con el desarrollo de la diabetes y la prediabetes.

Resumiendo, dado que los antisépticos actuales no tienen una diana celular bacteriana distinta sobre la que actuar, el uso (a largo plazo) de agentes antisépticos, especialmente a altas concentraciones, puede eliminar una biopelícula y/o destruir las bacterias asociadas a una enfermedad, pero simultáneamente destruir las bacterias asociadas a la salud y alterar las propiedades naturales y beneficiosas de la microflora bucal residente. De manera adicional, una microbiota alterada, que normalmente protege las superficies del huésped, puede permitir la colonización de patógenos (oportunistas) que causan enfermedades, tales como candidiasis y otras infecciones fúngicas. Por lo tanto, actualmente no existe ningún tratamiento para reducir la disbiosis asociada a las enfermedades periodontales, mientras que los tratamientos antisépticos tienen importantes efectos secundarios negativos.

En el caso de la halitosis, los tratamientos actuales también incluyen medios físicos o químicos para disminuir el número de bacterias, productos para enmascarar el olor o productos químicos para modificar las moléculas que crean el olor. Los enjuagues bucales antibacterianos pueden ayudar. Contienen a menudo agentes antibacterianos que incluyen cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, gluconato de zinc, aceites esenciales, peróxido de hidrógeno y dióxido de cloro, que tienen los mismos problemas que los mencionados anteriormente para las enfermedades periodontales y, por tanto, la disbiosis no se resuelve y también se pueden destruir las bacterias bucales beneficiosas.

El pensamiento actual en odontología preventiva sostiene que modificar o modular la biopelícula bucal, en lugar de eliminarla por completo, es la estrategia más prometedora para prevenir las enfermedades bucales. Sin embargo, existen datos muy limitados sobre el efecto positivo de los prebióticos para modular las biopelículas bucales. El caso con mayor grado de evidencia es el de la arginina, un aminoácido que varias bacterias asociadas a la salud son capaces de convertir en amoníaco, que debido a sus propiedades alcalinas, es capaz de tamponar

el pH salival y de la placa. Como consecuencia de esto, se ha descubierto que una alta actividad arginilítica bucal está relacionada con una baja experiencia de caries. Sin embargo, no se ha propuesto que la arginina sea eficaz contra otras enfermedades bucales como la periodontitis o la halitosis, que normalmente se ven favorecidas por entornos alcalinos y por la presencia de altos niveles de proteínas o aminoácidos. De hecho, la evidencia clínica muestra que la arginina mejora el riesgo de caries a costa de aumentar los niveles de varias bacterias fuertemente asociadas a las enfermedades periodontales y a la halitosis, como *Treponema*, *Eubacterium* o *Prevotella* (Koopman *et al.*, 2016). Esto implica que la administración de arginina puede, de hecho, aumentar la disbiosis en la cavidad bucal y solo podría prescribirse para prevenir la caries dental. Por tanto, existe la necesidad de hallar composiciones pre- y probióticas que prevengan una enfermedad bucal mientras no aumenten las bacterias asociadas a otras enfermedades bucales.

En conclusión, se cree que actualmente no existen tratamientos dirigidos a reducir la disbiosis relacionada con las enfermedades bucales sin efectos secundarios negativos, por lo que es deseable buscar alternativas o productos mejorados centrados en el manejo de la disbiosis.

Vía de nitrato en la cavidad bucal

Los seres humanos tienen bajas cantidades de nitrato en su cuerpo ya que ciertas células humanas producen óxido nítrico a partir de aminoácidos que se oxidan a nitrato. Las concentraciones de nitrato se potencian con nitrato (NCO_3^-) en nuestra dieta. Se obtiene más del 90 % de nitrato procedente de las frutas y verduras, y se encuentran cantidades particularmente altas en las verduras de hoja verde y en las remolachas. El cuerpo humano por sí solo no puede hacer nada importante con el nitrato. Sin embargo, ciertas bacterias bucales convierten el nitrato en nitrito y el cuerpo humano puede convertir eficazmente el nitrito en óxido nítrico mediante varios procesos enzimáticos y no enzimáticos. Los descubridores relacionados con el óxido nítrico (NO) ganaron un Premio Nobel en 1998 y esta importante molécula está implicada en muchas funciones importantes del cuerpo humano, p. ej.: la comunicación de las neuronas, la actividad antimicrobiana del estómago y la regulación de la presión arterial mediante la vasodilatación.

Diferentes grupos de investigación se han centrado en los beneficios sistémicos, principalmente cardiovasculares, del nitrato, pero los estudios que investigan los efectos del nitrato dentro de la boca son limitados.

Como se trata a continuación y sin quedar limitado a la teoría, los presentes inventores creen que ningún documento del estado de la técnica describe directamente e inequívocamente el uso de nitrato para prevenir o reducir la disbiosis y promover la eubiosis de la placa dental y otras biopelículas bucales.

En el ámbito cardiovascular, se trata en el presente documento el contenido de los artículos de Velmurugan *et al.*, 2016 y Vanhatalo *et al.*, 2018.

Velmurugan *et al.*, 2016 describe un ensayo clínico centrado en los beneficios cardiovasculares del nitrato en la dieta, donde se midieron los perfiles bacterianos bucales en la saliva. Tras 6 semanas de consumo diario de zumo de remolacha rico en nitrato, que contenía 372 mg por ración (es decir, 1,7 veces la ingesta diaria admisible, IDA, que es de 222 mg para un adulto de 60 kg), 78 taxones bacterianos se vieron afectados, y 2 especies de reducción de nitrato, *Rothia mucilaginosa* y *Neisseria flavescens*, aumentaron de manera destacable. No se mencionan otros cambios en las especies bacterianas en este documento. Concluyen que la ingestión sostenida

de nitrato en la dieta mejora la función vascular en pacientes hipercolesterolémicos. Estos cambios se asocian a alteraciones en el microbioma de la saliva y, en particular, en los géneros de reducción de nitrato.

Vanhatalo *et al.*, 2018 describe los cambios en la microbiota bucal detectados en la saliva tras el aporte complementario de nitrato y sus efectos en la función endotelial vascular y, por lo tanto, en la presión arterial.

5 Examinaron las relaciones entre la microbiota bucal y los índices fisiológicos de biodisponibilidad de NO y los posibles cambios en estas variables después de 10 días de aporte complementario de zumo de remolacha. Después de 10 días, el microbioma salival se alteró en comparación con el placebo, aumentando las abundancias relativas de *Rothia* (+127 %) y *Neisseria* (+351 %), y disminuyendo *Prevotella* (-60 %) y *Veillonella* (-65 %). El aporte complementario de NO_3^- aumentó la concentración plasmática de nitrito (NO_2^-) y redujo la presión arterial

10 sistémica en los participantes de edad avanzada, pero no en los jóvenes. Las altas abundancias de *Rothia* y *Neisseria* y las bajas abundancias de *Prevotella* y *Veillonella* se correlacionaron con un mayor aumento de la concentración plasmática de $[\text{NO}_2^-]$ en respuesta al aporte complementario de nitrato. Cabe destacar que, en este estudio, el zumo de remolacha se administra durante 10 días y leyendo detenidamente el artículo, se confirma que solo han encontrado estos cambios significativos de estas bacterias en la saliva, puesto que las mediciones de la

15 lengua solo se toman en un tiempo 0, pero no después: "Se recogieron hisopos bucales del dorso de la lengua en el valor inicial. Se recogieron muestras de saliva (~ 1 ml) por expectoración, sin estimulación, durante un período de 5 min en tres ocasiones seguido de los períodos de placebo y de aporte complementario de remolacha". Por el contrario:

- Los resultados sobre los cambios bacterianos obtenidos por los presentes inventores se encuentran en una biopelícula, mientras que los resultados de Vanhatalo, así como de Velmurugan *et al.*, se encuentran en la saliva.

- Las enfermedades bucales son enfermedades mediadas por biopelículas (Kuang *et al.*, 2018), por tanto, son causadas por diferentes biopelículas. El contenido en la saliva no se correlaciona con la composición de ninguna biopelícula bucal específica (véase Mira 2018, o Simón-Soro *et al.*, 2013); por tanto, los cambios

25 microbianos en la saliva como consecuencia del aporte complementario de nitrato no pueden predecir los cambios en una biopelícula específica ni predecir los resultados de salud en las enfermedades mediadas por biopelículas.

- Las muestras de saliva en Vanhatalo se recogieron los días 8, 9 y 10 de cada período de aporte complementario. Se trató de un diseño transversal, con 10 días de tratamiento, un período de lavado de 3-47 días (un promedio de 18 días) y un segundo tratamiento de 10 días. El aporte complementario de nitrato en Vanhatalo

30 tiene una duración de 10 días.

- El estudio de Vanhatalo se enmarca en el contexto de las enfermedades cardiovasculares.

- Los resultados sobre los cambios bacterianos de los presentes inventores son extraordinariamente diferentes de los obtenidos en Vanhatalo como se explicará en lo sucesivo.

- Vanhatalo usa una dosis extremadamente alta de nitrato (es decir, 770 mg por día), que es alrededor de

35 3,5 veces de IDA (es decir, 222 mg para un adulto de 60 kg). En la presente invención se respeta el intervalo de concentración fisiológica de la saliva (EJEMPLO 1) y la IDA para la ingesta de la composición de nitrato (EJEMPLOS 2 y 4), y los efectos se observan con una única dosis baja de nitrato.

Koopman *et al.*, 2016 señala en el resumen: "El nitrato está emergiendo como un posible benefactor de la salud. Especialmente la conversión microbiana de nitrato en nitrito en la cavidad bucal y la posterior conversión en óxido nítrico en el estómago son de interés en este sentido. Con todo, no se comprende por completo cómo el nitrato influye en la composición y en la bioquímica del ecosistema bucal. Para investigar el efecto del nitrato en la ecología bucal, los autores realizaron un experimento de 4 semanas usando el modelo de biopelícula de boca artificial multiplaca (BAM)". Aplicaron pulsos de nitrato 5 mM de 6 minutos a microcosmos bucales de 1-4 semanas de dos individuos, que crecieron con el suministro continuo de nitrato 1 mM, y cada uno de ellos respondió de forma diferente al nitrato en los cambios de composición bacteriana. No se detectó un efecto sobre el tamponamiento del pH, la producción de amoníaco o lactato, y el número de participantes era demasiado bajo para concluir cómo cambia la composición de una biopelícula. Por lo tanto, Koopman no proporciona ningún resultado que pueda interpretarse como evidencia de que el suministro de nitrato pueda reducir la disbiosis, promover la eubiosis mediante la eliminación de patógenos bucales y/o el tamponamiento del pH y/o la reducción de la producción de lactato.

Jockel-Schneider *et al.*, 2016 describe que la inflamación gingival en pacientes con gingivitis crónica se redujo tras 14 días de ingesta de nitrato. El artículo señala en la página 607: "Como este ensayo se centró principalmente en el impacto clínico de la ingestión de nitrato en la dieta, solo puede especularse cuál de los mecanismos y vías antes mencionados contribuyó a los presentes hallazgos". Cabe destacar que este estudio es esencialmente clínico y no se examina el microbioma bucal.

Li *et al.*, 2007 afirma que "la incubación anaeróbica de saliva que contiene una mezcla de bacterias bucales en presencia de sustratos de nitrato/nitrito y glucosa dio como resultado un pH más alto que el encontrado en los controles en ausencia de nitrato/nitrito". Hay que tener en mente que, todas las muestras de saliva de 13 donantes diferentes usadas en sus experimentos *in vitro* se modifican antes de su uso. De manera específica, todas las muestras se diluyeron con volúmenes iguales de agua, se desgasificaron con nitrógeno o se enriquecieron con oxígeno, y el pH de las muestras se ajustó a 7,0 mediante la adición de 2 moles de NaOH y/o HCl. Es más, en la mayoría de los experimentos, la saliva se preincubó durante 12 h a 30 °C antes de añadir glucosa (110 mM = 2 %) y nitrato o nitrito (ambos 1,5 mM). La preincubación durante 12 h a una temperatura diferente a la del cuerpo humano cambiará sustancialmente la composición de los microorganismos en la muestra, dando una ventaja selectiva a un subgrupo de especies que crecen o sobreviven mejor en esas condiciones experimentales. Por lo tanto, las observaciones en sus muestras modificadas no reflejan necesariamente lo que ocurriría en la muestra inicial y, desde luego, no lo que ocurriría en la cavidad bucal. En el otro experimento restante, donde las muestras no se preincubaron después de las modificaciones iniciales, estos centrifugan y lavan la saliva tres veces en PBS antes de volver a suspender el sedimento salival (que contiene los microorganismos) en PBS hasta el volumen original, lo que significa que todos los demás componentes salivales (incluidos los nutrientes y las sales tamponantes de pH) se descartan. Una vez más, esto no refleja la situación real *in vivo*. Al modificar las muestras de saliva en su estudio, las condiciones *in vitro* no son una buena representación de la situación *in vivo*. De manera adicional, al medir el efecto de los microorganismos en la saliva, no se consideran los posibles efectos del metabolismo de la biopelícula bucal (p. ej., la placa dental y el recubrimiento lingual) en el pH

salival. Por último, los autores solo encontraron un efecto del nitrato sobre la acidificación cuando las muestras crecen sin oxígeno. Sin embargo, en la cavidad bucal existen nichos con diferentes niveles de oxígeno. Por lo tanto, se puede concluir que las condiciones experimentales no naturales en el trabajo de Li *et al.*, hacen imposible predecir la actividad natural de las biopelículas bucales expuestas a nitrato.

5 Rosier *et al.*, 2018 indica que "Otro prebiótico potencial es el nitrato, pero la evidencia actual *in vivo* en seres humanos es limitada. En un ensayo clínico reciente centrado en los beneficios cardiovasculares del nitrato en la dieta, se midieron los perfiles bacterianos bucales (Velmurugan *et al.*, 2016). Tras 6 semanas de consumo diario de zumo de remolacha rico en nitrato, 78 taxones bacterianos se vieron afectados, y 2 especies de reducción de nitrato, *Rothia mucilaginosa* y *Neisseria flavescens*, aumentaron de manera destacable". Estas mediciones, sin embargo, se realizaron en la saliva, no en las biopelículas bucales y en el contexto de un trabajo clínico para analizar la salud cardiovascular, no la salud bucodental. Asimismo, los cambios observados se midieron después de un aporte complementario de dosis altas diario a largo plazo (6 semanas) y, por lo tanto, el efecto a corto plazo del aporte complementario de nitrato (es decir, <24 h) sigue siendo desconocido. Esta revisión también menciona que "los prebióticos pueden impulsar cambios beneficiosos en el microbioma bucal y podrían aumentar la resistencia a la disbiosis y la recuperación de la salud", pero solo aporta evidencias para la arginina.

Resumiendo, los artículos tratados anteriormente no mencionan cambios en las biopelículas, solo en la saliva. También se centran en los efectos a largo plazo del aporte complementario de nitrato (entre 1-6 semanas). Por lo tanto, los presentes inventores creen que son los primeros en observar cambios en las mismas bacterias y en otras bacterias y funciones bacterianas más relevantes en biopelículas crecidas *in vitro* después de 5 h y 9 h, o en seres humanos después de menos de 24 h, así como en proponer su efecto beneficioso en todas las enfermedades bucales mediadas por biopelículas.

El único artículo que muestra cambios en una biopelícula (muestra de lengua) es el de Burpleigh *et al.*, 2019. Observaron que tras 7 días de consumo de remolacha, hay un aumento en el pH salival y que las bacterias cambian en la lengua: *Neissera* aumenta y *Prevotella*, *Actinomyces* y *Streptococcus* disminuyen. Cabe destacar que:

- Se trata de un cambio tras el consumo diario de nitrato durante 7 días (efecto a largo plazo) y en el presente documento se muestra después de 5 horas (efecto inmediato a corto plazo).

- Burpleigh usa una dosis extremadamente alta de nitrato (es decir, 770 mg por día: 385 mg por la mañana y 385 mg por la tarde), que es aproximadamente 3,5 veces la IDA. De nuevo, en la presente invención, se respeta el intervalo de concentración fisiológica de la saliva (EJEMPLO 1) y la IDA para la ingesta de la composición de nitrato (EJEMPLOS 2 y 4) y los efectos se observan con una única dosis baja de nitrato.

- El placebo usado en el estudio de Burpleigh es un zumo de remolacha agotado de nitrato que contiene una gran cantidad de azúcar, que, sin la presencia de nitrato, disminuye significativamente el pH de las biopelículas bucales. Se ha demostrado que un pH bajo selecciona microorganismos específicos tolerantes a ácidos, lo que podría afectar a sus resultados, especialmente puesto que proporcionan dos dosis de zumo (placebo) por día y la frecuencia de la ingesta de azúcar es un factor importante en la modulación de la microbiota y el desarrollo de la caries.

- Relacionan los cambios observados en la microbiota lingual con la caries y las enfermedades periodontales, mientras que el experto en la materia sabe que dichas enfermedades son causadas por cambios en la placa dental, no en la lengua.

- En el análisis hacen algunas asociaciones confusas como que los cambios observados en la microbiota podrían prevenir la acidificación y que la acidificación está vinculada con la caries y las enfermedades periodontales. Esto no puede considerarse cierto: la acidificación solo está vinculada a la caries y evitaría el crecimiento de los periopatógenos en lugar de estimularlo. De manera adicional, *Prevotella* no está vinculada a la acidificación de ninguna manera. Por el contrario, *Prevotella* es una especie proteolítica y el metabolismo proteolítico aumenta el pH (Takahashi 2005). Por lo tanto, la asociación de Bursliegh con un aumento de *Prevotella* y la acidificación es errónea.

La patente JP 2015 157768 A se describe una composición que comprende *Rothia* y nitrato o iones nitrato para administración a la cavidad bucal para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Como se ve, el estado de la técnica es confuso al usar la composición bacteriana en la saliva y no en las biopelículas bucales, que es donde tienen lugar las enfermedades bucales. Asimismo, cuando se consideran las biopelículas bucales, estos usan las biopelículas de la lengua, que no son relevantes para la caries o para las enfermedades periodontales. Es más, cambios en la composición bacteriana salival o lingual solo se estudian tras un aporte complementario a largo plazo (>1 semana) en el contexto de estudios clínicos de salud cardiovascular y no están diseñados para estudiar el efecto del nitrato en la salud bucodental a través de la disbiosis bacteriana. El estado de la técnica tampoco es claro a la hora de describir las funciones subyacentes que cambian tras el aporte complementario de nitrato, ya sea mostrando evidencias contradictorias o no aportando evidencias del mecanismo implicado en la reducción de la disbiosis, mientras que los presentes inventores muestran que esto se consigue mediante varias funciones como la producción de amoníaco, la producción de óxido nítrico o la depleción de lactato. También es relevante que, los beneficios potenciales del nitrato para la salud bucodental nunca se proponen para todas las enfermedades bucales en conjunto, y cuando se proponen individualmente, los desencadenantes de una enfermedad para una enfermedad bucal se usan de forma confusa para referirse a otras enfermedades bucales (p. ej., indicando erróneamente que el pH ácido puede causar la enfermedad periodontal). Resumiendo, y sin quedar limitado a la teoría, los presentes inventores consideran que ningún documento de la técnica anterior describe directamente e inequívocamente el uso del nitrato para prevenir o reducir la disbiosis bacteriana o promover la eubiosis desde el punto de vista de la caries, las enfermedades periodontales y la halitosis. Además, también se demuestra en el presente documento que el nitrato puede tener un efecto prebiótico agudo promoviendo las bacterias asociadas a la salud y reduciendo las bacterias asociadas a una enfermedad y las funciones en las biopelículas, lo que deriva en una acción beneficiosa contra todas las enfermedades bucales mediadas por biopelículas, incluyendo caries, periodontitis, halitosis y periimplantitis.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El problema a resolver por la presente invención puede verse como la provisión de un método para reducir o prevenir la disbiosis bucal y aumentar la eubiosis bucal y, de este modo, proporcionar un método mejorado para el tratamiento o la prevención de una enfermedad bucal mediada por biopelículas, tal como, p. ej., caries,

enfermedades periodontales (p. ej., gingivitis, periodontitis o periimplantitis) y halitosis.

Como se trata en los Ejemplos prácticos en el presente documento, los inventores identificaron que el nitrato puede usarse para reducir la disbiosis y promover la eubiosis en las biopelículas bucales.

Como se ha tratado anteriormente, los presentes inventores creen que ningún documento de la técnica anterior describe directamente e inequívocamente el uso del nitrato para reducir la disbiosis y promover la eubiosis en las biopelículas bucales.

Es evidente que el uso novedoso de nitrato tratado en el presente documento para reducir la disbiosis y promover la eubiosis puede ser visto como una contribución a la técnica que cambia el comportamiento del experto en la materia; a modo de ejemplo, en función de la enseñanza en el presente documento, es plausible que, p. ej., una pasta de dientes novedosa que comprende una cantidad relevante de nitrato (p. ej., en lugar de o además del flúor usado hoy en día) sea adecuada para el tratamiento y/o la prevención de la caries, las enfermedades periodontales o la halitosis debido a la reducción de la disbiosis y a la promoción de la eubiosis.

A diferencia de las limitaciones mencionadas anteriormente en el caso de la arginina como tratamiento, para los presentes inventores fue sorprendente que la administración de nitrato en las biopelículas bucales proporcionara un efecto de tamponamiento del pH y una reducción de las bacterias asociadas a la caries, al tiempo que reducía los niveles de bacterias asociadas a la periodontitis y asociadas a la halitosis. Por lo tanto, los presentes inventores creen que, a la luz de evidencias aportadas en el presente documento, el nitrato puede considerarse un producto que realmente reduce la disbiosis y/o promueve una composición bacteriana eubiótica en las biopelículas bucales, a diferencia de la arginina que aumenta las bacterias asociadas a las enfermedades periodontales y a la halitosis.

De manera notable, esto hace que el tratamiento con nitrato sea un tratamiento eficaz para varias enfermedades a la vez, lo que puede ser visto como una gran contribución a la técnica, p. ej., en la industria del cuidado bucal puesto que con una sola composición (p. ej., pasta de dientes) es posible tratar y prevenir tanto la caries como las enfermedades periodontales, así como la halitosis.

Resumiendo, basándose en los resultados proporcionados en el presente documento, se puede considerar plausible que el nitrato pueda usarse como prebiótico para mejorar la salud bucodental general, p. ej., reduciendo o previniendo la disbiosis bucal y aumentando la eubiosis bucal, y proporcionando de este modo un método mejorado para el tratamiento o la prevención de una enfermedad bucal mediada por biopelículas, tal como, p. ej., caries, enfermedades periodontales (p. ej., gingivitis, periodontitis o periimplantitis) y halitosis.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición oral que comprende nitrato para su uso en un tratamiento agudo o la prevención de la disbiosis bucal en un mamífero, donde el tratamiento agudo o la prevención de la disbiosis oral comprende cambiar la composición bacteriana y las funciones de las biopelículas orales en un mamífero, y disminuir la cantidad de bacterias asociadas a enfermedades y aumentar la cantidad de bacterias asociadas a la salud; donde la composición se administra por vía oral al mamífero y, de este modo, aumenta la concentración de nitrato en la saliva de la boca; donde la cantidad de nitrato por dosis de composición es al menos 3 microgramos cuando la composición oral es

una composición aplicada tópicamente, y al menos 12 microgramos cuando la composición oral es una composición ingerida; y

donde el tratamiento agudo o prevención tiene efectos antes de 24 horas de una enfermedad bucal mediada por biopelículas.

5 El término "disbiosis" se usa para describir una variación de especies y funciones bacterianas asociadas a una enfermedad. Diferentes enfermedades, tales como caries, gingivitis, periodontitis, periimplantitis y halitosis tienen diferentes composiciones disbióticas. De manera adicional, si bien la caries, la gingivitis y la periodontitis son el resultado de una composición disbiótica de las biopelículas dentales (placa dental), la halitosis es el resultado de una composición disbiótica de la biopelícula lingual (recubrimiento lingual) y la periimplantitis de una de una
10 biopelícula en un implante.

En la disbiosis, aparte de un aumento en las especies y funciones asociadas a una enfermedad, se pierden las especies y funciones asociadas a la salud. Si se elimina cualquier biopelícula bucal, las bacterias de la saliva forman una nueva biopelícula en esta superficie. En el EJEMPLO 1 y 6, los inventores obtuvieron la primera evidencia de que la presencia de nitrato mejora de forma aguda la composición de esta nueva biopelícula (p. ej.,
15 la placa dental tras el cepillado de dientes o el recubrimiento lingual tras el raspado de la lengua) reduciendo la disbiosis y aumentando las especies y funciones asociadas a la salud.

El EJEMPLO 2 y 7 proporcionan la primera evidencia *in vivo* de que un complemento rico en nitrato afecta a la actividad bacteriana directamente tras una única ingesta (es decir, un efecto agudo). Se demostró que este efecto se produce por aplicación tópica y por ingestión del producto. Por tanto, se demuestra que el nitrato
20 proporciona resiliencia frente a la disbiosis. De manera específica, los inventores demostraron que un complemento que contiene nitrato previene o limita la caída del pH debido al consumo de azúcar directamente (1 h), 1 h 45 min y 4 h después de la ingesta del complemento. Esta es la primera evidencia *in vivo* de que el nitrato previene el metabolismo asociado a la caries. El efecto fue mayor después de 4 h cuando la microbiota bucal había tenido más tiempo para cambiar debido al nitrato (reduciendo la disbiosis asociada a la caries o aumentando la eubiosis
25 asociada a la salud dental). Notablemente, a diferencia de otros nutrientes, los niveles de nitrato y nitrito en la saliva siguen siendo elevados después de 4 h debido a la actividad de reciclaje de nitrato en plasma de las glándulas salivales.

Como entiende el experto en la materia en el presente contexto, el uso de nitrato para reducir la disbiosis y promover la eubiosis en las biopelículas bucales en los términos del primer aspecto de la invención, es un uso
30 claramente diferente del nitrato, p. ej., en los usos de la técnica anterior anteriormente tratados. Las diferencias entre la presente invención y los documentos de la técnica anterior se explican en detalle en esta descripción. En el presente documento se destaca que la técnica anterior se refiere a un efecto a largo plazo de las dosis diarias de nitrato por encima de la IDA y las observaciones más relevantes se encuentran en muestras de saliva. En este sentido, es importante tener en cuenta que las bacterias bucales forman biopelículas en todas las superficies
35 bucales. Una biopelícula en los dientes (placa dental) y en la lengua (capa lingual) se observa a simple vista puesto que es donde se acumulan más bacterias. Por eso son las biopelículas más importantes para la salud bucodental, pero también se encuentran biopelículas en la cara interna de las mejillas, el paladar, etc. Existe una relación

importante entre la saliva y las biopelículas bucales: por un lado, las bacterias de todas las biopelículas y, a veces, de las vías respiratorias (resultantes, p. ej., del goteo nasal o la tos) entran en la saliva, lo que da lugar de diez millones a cien millones de bacterias por ml de saliva; por otro lado, cuando se elimina una biopelícula de una superficie, p. ej., con higiene bucodental, las bacterias de la saliva no tardan en colonizar la superficie y formar una nueva biopelícula. Sin embargo, las condiciones ambientales en cada superficie bucal determinan que las bacterias crecen bien, y por eso la capa lingual es muy diferente a la placa dental (en una persona sana, determinadas bacterias pueden ser abundantes en la placa dental y de baja abundancia en la capa lingual). Por tanto, ambas biopelículas comienzan con bacterias en la saliva, pero el producto final es muy diferente. Es importante tener en cuenta que la placa dental es la causa de la caries y de las enfermedades periodontales, mientras que la biopelícula lingual es la causa de la halitosis. La causa de la enfermedad no es una composición particular de bacterias en la saliva. Por lo tanto, las observaciones de la técnica anterior en muestras de saliva no pueden llevar a una consecuencia en una enfermedad mediada por biopelículas. En cambio, los presentes inventores han visto que el nitrato tiene un claro efecto en el cambio de la composición de las biopelículas bucales, consiguiendo de este modo un tratamiento o una prevención de las enfermedades bucales mediadas por biopelículas. El modelo de biopelícula *ex vivo* usado por los inventores refleja cualquier biopelícula formada por saliva; es decir, cualquier biopelícula bucal.

También se describe en la presente divulgación, pero no forma parte de la invención, una composición que comprende nitrato para su uso en el tratamiento o la prevención de la halitosis y donde la composición se administra por vía oral al mamífero y, de este modo, aumenta la concentración de nitrato en la saliva de la boca. Al disminuir las bacterias productoras de CSV, la cantidad de producción de CSV disminuirá inevitablemente.

Los inventores también han descubierto que los individuos tienen diferentes capacidades de reducción de nitrato (CRN, es decir, la capacidad de su microbiota bucal para reducir el nitrato en nitrito) y que esta capacidad puede estimularse con probióticos de reducción de nitrato (EJEMPLO 3). Incluso en un individuo con una CRN baja a indetectable, la adición de probióticos de reducción de nitrato dio lugar a una CRN significativa *in vitro*. Para obtener probióticos potenciales, se aislaron 62 cepas de reducción de nitrato y se seleccionaron los 10 mejores reductores de nitrato, que eran todos *Rothia* spp. De estas 10 cepas, se seleccionaron 7 aislados con diferentes propiedades (cinco cepas de *Rothia mucilaginosa*, una cepa de *R. dentocariosa* y una de *R. aeria*). De manera específica, estos 7 aislados redujeron el nitrato y el nitrito a diferentes tasas a niveles de pH establecidos (p. ej., algunos redujeron mejor el nitrato a un pH ácido y otros a un pH neutro). Cada aislado es adecuado para tratar y prevenir los estados disbióticos y mejorar la resiliencia frente a diferentes enfermedades bucales (p. ej., la caries tiene un pH ácido, mientras que la periodontitis tiene un pH neutro a ligeramente alcalino). De manera adicional, los aislados que reducen el nitrato, pero no reducen la mayor parte del nitrito, son adecuados para prevenir y tratar afecciones sistémicas (p. ej., hipertensión y diabetes), ya que los niveles de óxido nítrico en el cuerpo aumentan al deglutir nitrito.

También se describe en la presente divulgación, pero no forma parte de la invención, una composición que comprende nitrito y/o una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia*, *Neisseria* o *Kingella*, para su uso en el aumento de la capacidad de reducción de nitrato de un mamífero, mediante el aumento agudo de la

cantidad de bacterias de reducción de nitrato en las biopelículas bucales, consiguiendo de este modo un tratamiento o prevención de una enfermedad o estado que se beneficia del suministro de óxido nítrico.

Con respecto a esto, los inventores han identificado por lo tanto bacterias particulares con características beneficiosas para ser usadas como probióticos, p. ej., en individuos con capacidad deficiente de reducción de nitrato. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una cepa bacteriana donde la cepa bacteriana pertenece al género *Rothia*, y donde la cepa bacteriana *Rothia*:

a) reduce el 100 % de nitrato tras 7 h de incubación a 37 °C partiendo de una densidad óptica (DO) de 0,01 en medio ICC con nitrato 6,5 mM;

b) reduce más del 15 % de nitrato tras 4 h de incubación a 37 °C partiendo de una DO de 0,01 en medio ICC con nitrato 6,5 mM;

c) no disminuye el pH del medio ICC con nitrato 6,5 mM tras 7 h de incubación a 37 °C partiendo de una DO de 0,01 por debajo de un pH 6,8;

d) crece hasta alcanzar una densidad óptica superior a 0,7 tras 7 h de crecimiento en medio ICC con nitrato 6,5 mM a 37 °C partiendo de una densidad óptica DO de 0,01; y

e) es capaz de colonizar una biopelícula bucal *in vitro* crecida a partir de saliva humana durante 5 h a 37 °C cuando se añade 1:1 de cepa bacteriana de *Rothia* en ICC (DO 0,40):inóculo de saliva, alcanzando una proporción superior al 10 % de las bacterias totales en la biopelícula formada.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en una cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con los números de acceso CECT 9999, CECT 30000, CECT 30001, CECT 30002, CECT 30003, CECT 30004, CECT 30005 o combinaciones de la misma. Otros aspectos relacionados de la invención se refieren a las composiciones que comprenden las cepas bacterianas para su uso como medicamentos. Este aspecto puede formularse alternativamente como un método para un tratamiento probiótico, que comprende administrar en una necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos una cepa bacteriana. El término "probiótico", como se usa en el presente documento, se refiere a microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped.

También se describe en la presente divulgación, pero no forma parte de la invención, a un método para seleccionar un tratamiento terapéutico o una estrategia preventiva para una enfermedad bucal mediada por biopelículas o una enfermedad o estado que se beneficia del suministro de óxido nítrico, comprendiendo el método:

i) medir la capacidad de reducción de nitrato de un sujeto en una muestra bucal;

ii) clasificar al sujeto de acuerdo con el grado de capacidad de reducción de nitrato del sujeto, donde, cuando la capacidad de reducción de nitrato se mide añadiendo 0,05 ml de nitrato 80 mM a una muestra bucal en ayunas de 0,45 ml para alcanzar un volumen final de 0,5 ml y una concentración final de nitrato de 8 mM e incubándose durante 2 horas a 37 °C,

ii.1) una disminución de la cantidad de nitrato de la muestra bucal por debajo de 57 mg/l es indicativa de una capacidad deficiente de reducción de nitrato,

ii.2) una disminución de la cantidad de nitrato de la muestra bucal entre 57 mg/l y 175 mg/l, inclusive, es

indicativa de una capacidad intermedia de reducción de nitrato, y

ii.3) una disminución de la cantidad de nitrato de la muestra bucal por encima de 175 mg/l es indicativa de una buena capacidad de reducción de nitrato; y

iii) seleccionar un tratamiento terapéutico o una estrategia preventiva de acuerdo con la capacidad de reducción de nitrato, donde:

iii.1) a un sujeto con una capacidad deficiente de reducción de nitrato se le administra una composición que comprende nitrato y una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia* o *Neisseria*,

iii.2) a un sujeto con una capacidad intermedia de reducción de nitrato se le administra una composición que comprende nitrato y/o una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia* o *Neisseria*, y

iii.3) a un sujeto con una buena capacidad de reducción de nitrato se le administra una composición que comprende nitrato.

DEFINICIONES

Todas las definiciones de los términos pertinentes en el presente documento están de acuerdo con lo que entendería un experto en la materia en relación con el contexto técnico relevante en el presente documento.

Las enfermedades bucales (es decir, relativas a la boca) incluyen las enfermedades dentales (p. ej., caries) o las enfermedades periodontales (p. ej., gingivitis, periodontitis o periimplantitis) y la halitosis (un síntoma en el que está presente un aliento fuerte notoriamente desagradable).

La biopelícula bucal o placa es una biopelícula o masa de bacterias que crece en las superficies dentro de la boca. El crecimiento de biopelículas bucales es importante para las enfermedades bucales. Las enfermedades bucales dependen del nicho (encías para la periodontitis, lengua para la halitosis, dientes para la caries) y están mediadas por biopelículas.

El término "disbiosis", también denominado disbacteriosis, se usa para describir una variación (o desequilibrio) de las especies y funciones bacterianas asociadas a una enfermedad. La microbiota tiene una relación comensal con el huésped; las bacterias prosperan en el rico entorno de la boca, mientras que el huésped se beneficia de las múltiples funciones que proporcionan las bacterias. El equilibrio homeostático de la microbiota bucal es extremadamente beneficioso para el huésped, sin embargo, si se produce un cambio en la composición microbiana que cause un desequilibrio drástico entre las bacterias beneficiosas (es decir, asociadas a la salud) y las potencialmente patógenas (es decir, asociadas a una enfermedad), la boca se vuelve vulnerable a las agresiones patógenas con alteraciones microbianas. Este desequilibrio en el equilibrio microbiano se denomina "disbiosis", que se ha definido además como una alteración de la homeostasis de la microbiota debido a un desequilibrio de la propia flora, a cambios en su composición funcional y actividades metabólicas, o a cambios en su distribución local. En general, la disbiosis puede clasificarse en tres tipos diferentes: 1) Pérdida de organismos y/o funciones beneficiosos, 2) Crecimiento excesivo de organismos y/o funciones potencialmente perjudiciales, y 3) Pérdida de la diversidad microbiana general. Se ha descubierto que estos tres tipos no son mutuamente excluyentes y pueden darse al mismo tiempo, lo que ocurre con mucha frecuencia. Más detalles acerca del concepto de disbiosis se describen en DeGruttola *et al.*, 2016.

La disbiosis puede considerarse una entidad clínica o un estado previo a la enfermedad, por tanto sujeta

a tratar o prevenir. Por ejemplo, en un individuo sano, el consumo de azúcar puede aumentar las especies cariogénicas y la producción de lactato disbiótico, disminuyendo el pH a niveles que pueden desmineralizar el esmalte. En un individuo sano, estos cambios pueden revertirse rápidamente (resiliencia). Sin embargo, si se consume azúcar de forma continuada, con el tiempo, la disbiosis puede volverse estable debido a una microbiota más cariogénica (es decir, más especies adaptadas al metabolismo del azúcar) y pueden formarse caries. Un enfoque sería aumentar la resiliencia en los individuos sanos mediante el aumento de la eubiosis (prevención), mientras que otro enfoque sería disminuir la disbiosis en los individuos con caries activa (tratamiento). Lo mismo ocurre con el aumento de la eubiosis y la disminución de la disbiosis relacionada con las enfermedades periodontales y la halitosis.

El término "eubiosis" (también denominado "probiosis") de las biopelículas bucales se refiere a una composición de la microbiota con mayores niveles de bacterias beneficiosas y/o actividad bacteriana, mientras que las especies asociadas a una enfermedad están presentes, pero en menor abundancia. La eubiosis incluye una mayor resiliencia frente a las enfermedades, lo que significa una mayor resistencia a los desencadenantes de una enfermedad (es decir, un efecto protector ante cualquier factor que pueda causar una enfermedad) y una recuperación más rápida de una perturbación causada por un desencadenante de una enfermedad. Más detalles acerca del concepto de eubiosis se describen en *Iebba et al.*, 2016 y de disbiosis y resiliencia en *Rosier et al.*, 2018.

La composición de acuerdo con la invención reduce o previene la disbiosis bucal. Los sinónimos de la expresión "reducción de la disbiosis" en esta descripción son "reversión de la disbiosis", "modulación de la disbiosis", "modulación de la composición de biopelícula bucal", o tiene un "efecto antidisbiosis". En particular, la reducción de la disbiosis está relacionada con "la disminución de las bacterias/actividades bacterianas que dan lugar a la producción de compuestos sulfúricos volátiles", "la disminución de las bacterias/actividades bacterianas que reducen el pH", "la disminución de las bacterias/actividades bacterianas que causan inflamación", así como "el aumento de las bacterias/actividades bacterianas que previenen la producción de compuestos sulfúricos volátiles", "el aumento de las bacterias/actividades bacterianas que previenen la caída del pH", "el aumento de las bacterias/actividades bacterianas que previenen la inflamación".

Además, la composición de acuerdo con la invención aumenta la disbiosis bucal. Los sinónimos de la expresión "aumento de la eubiosis" son "mejora de la homeostasis y la simbiosis", "estimulación de una composición saludable de las biopelículas bucales". Se caracteriza por una mejor resiliencia, lo que significa una mejor recuperación de y resistencia a desencadenantes de una enfermedad resultantes de la actividad de la microbiota. Esto incluye también "la disminución de las bacterias/actividades bacterianas que dan lugar a la producción de compuestos sulfúricos volátiles", "la disminución de las bacterias/actividades bacterianas que reducen el pH", "la disminución de las bacterias/actividades bacterianas que causan inflamación", así como "el aumento de las bacterias/actividades bacterianas que previenen la producción de compuestos sulfúricos volátiles", "el aumento de las bacterias/actividades bacterianas que previenen la caída del pH", "el aumento de las bacterias/actividades bacterianas que previenen la inflamación".

La disminución de la disbiosis y el aumento de la eubiosis se usan a menudo indistintamente. Sin embargo,

en un individuo sano sin disbiosis, debe afirmarse que si la composición mejora, la eubiosis aumenta, con los beneficios (es decir, resiliencia, protección) descritos anteriormente.

Diferentes enfermedades, tales como caries, gingivitis, periodontitis, periimplantitis y halitosis tienen diferentes composiciones disbióticas. Si bien la caries, la gingivitis y la periodontitis son el resultado de una composición disbiótica de las biopelículas dentales (placa dental), la halitosis es el resultado de una composición disbiótica de la biopelícula lingual (recubrimiento lingual) y la periimplantitis de una de una biopelícula en un implante. La biopelícula o placa dental es una biopelícula o masa en los dientes, incluyendo la placa subgingival o la placa supragingival. La biopelícula en la lengua se denomina recubrimiento lingual y es más gruesa en la parte posterior de la lengua.

La expresión "enfermedad mediada por biopelículas" se refiere a una enfermedad que se inicia y desarrolla por la actividad de las biopelículas microbianas más que por los microorganismos planctónicos o intracelulares. En las enfermedades mediadas por biopelículas, cuando la biopelícula está formada por especies de la microbiota, una mayor proporción de bacterias asociadas a una enfermedad y actividad bacteriana, así como una menor proporción de bacterias asociadas a la salud y actividad bacteriana, aumenta el riesgo y la gravedad de la patología.

De acuerdo con la técnica, el término "prebiótico" se refiere a un compuesto que induce/promueve el crecimiento o la actividad de microorganismos beneficiosos tales como bacterias y hongos.

La capacidad de reducción de nitrato (CRN) es la capacidad de la microbiota bucal de un individuo para reducir el nitrato en nitrito.

La expresión "bacterias asociadas a una enfermedad" se refiere a las bacterias que están presentes en mayor abundancia relativa en una determinada enfermedad o, por consiguiente, en menor abundancia relativa en la salud en la superficie donde puede desarrollarse la enfermedad. En ocasiones se han identificado funciones de bacterias asociadas a una enfermedad que contribuyen a una enfermedad bucal y, por lo tanto, las "bacterias asociadas a una enfermedad" también pueden denominarse bacterias "patógenas", "cariogénicas" o "periopatógenas".

La expresión "bacterias asociadas a la salud" se refiere a las bacterias que están presentes en menor abundancia relativa en una determinada enfermedad y, por consiguiente, en mayor abundancia relativa en la salud en la superficie donde puede desarrollarse la enfermedad. En ocasiones se han identificado funciones de bacterias asociadas a la salud que pueden prevenir el desarrollo de una enfermedad bucal y, por lo tanto, las "bacterias asociadas a la salud" también pueden denominarse "bacterias beneficiosas", "bacterias probióticas" o "probióticos".

Obsérvese que algunos géneros tienen especies asociadas a la salud y asociadas a una enfermedad, pero los géneros pueden seguir estando asociados a la salud o asociados a una enfermedad. Por ejemplo: *Streptococcus mutans* está asociada a la caries, mientras que *Streptococcus dentisani* está asociada a la salud (asociada sin caries). Sin embargo, el género *Streptococcus* siempre aumenta en la caries (diferentes *Streptococcus* cariogénicos aumentan mucho, mientras que *S. dentisani* puede estar disminuyendo), por lo que el género está asociado a una enfermedad.

La expresión "enfermedad o estado que se beneficia del suministro de óxido nítrico" se refiere a cualquier

afección o estado del cuerpo humano que mejora cuando aumentan los niveles de óxido nítrico sistémico (p. ej., hipertensión, se describen en lo sucesivo más ejemplos). El aumento de los niveles de óxido nítrico sistémico puede lograrse estimulando la reducción de nitrato por parte de la microbiota bucal con nitrato (prebiótico) o bacterias de reducción de nitrato (probiótico).

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "reducir" y derivados (p. ej., reducción o de reducción) en combinación con "nitrato" o "nitrito" se refiere a la conversión bacteriana de nitrato en nitrito, o a la conversión bacteriana o química de nitrito en óxido nítrico o amonio. Únicamente si no se combina con "nitrato" o "nitrito", la palabra "reducir" y derivados se usan normalmente para indicar una "disminución" o "descenso" de algo.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, no se pretende que la palabra "comprender" y sus variaciones excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención. Es más, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan en el presente documento con fines ilustrativos y sin pretender ser limitantes
15 de la presente invención.

Descripción de los dibujos

FIG. 1: Cuantificación de biopelículas. Biopelículas crecidas con saliva como inóculo en la condición de nitrato 6,5 mM (negro) y la condición de control (gris). Todos los valores presentados son promedios de 12 donantes (D13-D25) con sus correspondientes desviaciones típicas. A: el gráfico muestra los promedios de la masa de una
20 biopelícula, expresados como valores del índice celular (IC) a lo largo del tiempo (T), según indica el sistema xCELLigence, tras la normalización con saliva filtrada libre de microorganismos. Las mediciones se tomaron cada 10 minutos. Las barras de error con desviaciones típicas solo se muestran a intervalos de media hora para mayor claridad. Durante todos los experimentos de crecimiento de una biopelícula, a las 5 h y a las 9 h, se tomaron muestras para la cuantificación de proteínas. B: Cuantificación de proteínas de las biopelículas cosechadas a las
25 5 h y a las 9 h. P: proteína. No se observaron cambios significativos entre las dos condiciones.

FIG. 2: Mediciones de nitrato (A), nitrito (B), amonio (C), lactato (D) y pH (E) en biopelículas bucales crecidas *in vitro* con o sin nitrato. Los gráficos de barras muestran los promedios y las desviaciones típicas de las mediciones en muestras de sobrenadante de 12 donantes (D1-D12) de las condiciones de nitrato 6,5 mM (negro) y de control (gris) en diferentes momentos del crecimiento de la biopelícula (0 h, 5 h y 9 h). NO₃: nitrato. NO₂:
30 nitrito. Am: amonio. Lac: lactato. *** p < 0,005 ** p < 0,01, de acuerdo con una prueba de Wilcoxon.

FIG. 3: La acidificación salival es inhibida por nitrato. La saliva de 9 donantes (D25-D33) se incubó durante 5 h con un 0,2 % de glucosa y un intervalo de concentración de nitrato (0,5-8,5 mM), que está dentro del intervalo fisiológico de la saliva humana. En este gráfico, se muestran los promedios (puntos negros) con desviaciones típicas, así como los cuartiles superior e inferior (líneas grises). NO₃: nitrato. Todas las diferentes concentraciones
35 de nitrato se compararon con nitrato 0 mM y la significación se marcó con * para p < 0,05 y ** para p < 0,01 de acuerdo con una prueba de Wilcoxon.

FIG. 4: Diferencias en la composición bacteriana, según lo mostrado por el análisis de correspondencia

canónica (ACC) para las biopelículas de control (círculos) y de nitrato 6,5 mM (triángulos) a las 5 h (gris) y a las 9 h (negro) de crecimiento. Los valores p de Adonis y ACC (0,0017 y 0,001, respectivamente) sugieren diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos. El primer componente restringido separa claramente las dos condiciones experimentales (control y nitrato), mientras que el segundo componente refleja la variabilidad debido al tiempo (5 h y 9 h), mostrando que el nitrato influye en la composición bacteriana en los dos puntos temporales del desarrollo de la biopelícula.

FIG. 5: Cambios en la composición bacteriana de una biopelícula en condiciones de nitrato. Las gráficas de barras muestran el valor log2 de la relación [abundancia promedio en condiciones de nitrato]/[abundancia promedio en condiciones de control] de los 12 donantes. Los géneros mostrados son los que difieren significativamente entre las condiciones de nitrato y las de control a las 5 h o a las 9 h (* p < 0,05 sin ajustar y ** p < 0,01 sin ajustar de acuerdo con una prueba de Wilcoxon) o cuando se observa una tendencia de cambio. El grupo I incluye los géneros bacterianos asociados a la salud bucodental, el grupo II son géneros asociados a la caries y el grupo III son géneros asociados a la periodontitis y/o a la halitosis. Cada grupo está ordenado de los géneros más abundantes a los menos abundantes. Ne: *Neisseria*. Ro: *Rothia*. Ki: *Kingella*. St: *Streptococcus*. Ve: *Veillonella*. At: *Atopobium*. Or: *Oribacterium*. Pr: *Prevotella*. Po: *Porphyromonas*. Fu: *Fusobacterium*. Pe: *Peptostreptococcus*. Al: *Alloprevotella*. Le: *Leptotrichia*. Di: *Dialister*. Eu: *Eubacterium*. Pa: *Parvimonas*. Tr: *Treponema*. Ta: *Tannerella*. So: *Solobacterium*. Se: *Selenomonas*. Los círculos grises se sitúan delante de los géneros de las bacterias del complejo rojo asociadas a la periodontitis (Po, Tr y Ta). L(N/C): Log2(nitrato/control). Barras gris claro: biopelículas de 5 h; barras gris oscuro: biopelículas de 9 h.

FIG. 6: Niveles de nitrato en la saliva recogida por la mañana en un donante sano en condiciones de ayuno, tras la ingesta de un complemento rico en nitrato (220 mg de nitrato en 200 ml de agua) justo después de 0 h. Se observan dos picos, que ilustran el aumento directo de nitrato debido al contacto con el complemento tópico (0,5 h) y el aumento indirecto debido a la actividad de las glándulas salivales que recicla el nitrato del plasma (2,5 h). NO₃: nitrato. T: tiempo.

FIG. 7: Valores de pH salival con enjuague bucal previo y posterior al azúcar antes y después de una única dosis de un complemento rico en nitrato. Los datos muestran el efecto agudo sobre la actividad bacteriana tras la administración tópica de la composición de nitrato (A, estudio 2: efecto 1 h después de 300 mg de nitrato en 70 ml de ingesta, n = 6) e ingestión (B, estudio 3: efecto 4 h después de 220 mg de nitrato en ≥150 ml de ingesta, n = 6). VI: valor inicial. DC: después del complemento. Pre: enjuague bucal previo al azúcar. Post: enjuague posterior al azúcar. Los valores P se determinaron con una prueba de Wilcoxon en SPSS (v25).

FIG. 8: Valores de pH salival con enjuague bucal previo y posterior al azúcar antes y después de una única dosis de un complemento rico en nitrato. A: los datos muestran el efecto agudo sobre la actividad bacteriana tras la ingesta de la composición de nitrato (estudio 4: 1 h 45 min después de 250 mg de nitrato en 200 ml de ingesta, n = 12). B: las barras muestran la diferencia de pH de este complemento de nitrato con un complemento de placebo (barras rayadas). VI: valor inicial. DC: después del complemento. Pre: enjuague bucal previo al azúcar. Post: enjuague posterior al azúcar. Los valores P se determinaron con una prueba de Wilcoxon en SPSS (v25).

FIG. 9: Porcentaje de nitrato reducido por los 67 aislados bacterianos bucales tras 4 horas (A) y 7 horas

(B) de incubación a 37 °C. Las barras representan el porcentaje de nitrato inicial que se ha utilizado tras 4 h o 7 h de incubación. Los aislados que fueron seleccionados como probióticos potenciales redujeron al menos un 20 % del nitrato tras 4 h y un 100 % tras 7 h (líneas grises). Otros aislados, que están por debajo de las líneas grises en A o B, no fueron seleccionados. En el eje y se encuentran los nombres de los 67 aislados. NR4h: nitrato reducido después de 4 h. NR7h: nitrato reducido después de 7 h.

FIG. 10: Porcentaje de (A) nitrato reducido y (B) nitrito que queda en 10 aislados seleccionados tras 5 horas de incubación con nitrato a diferentes niveles de pH. Las barras gris claro con bordes negros corresponden a un pH 6, las barras gris oscuro corresponden a un pH 7 y las barras negras corresponden a un pH 7,5. A: Las barras representan los porcentajes de nitrato inicial que se han utilizado (100 % = se ha utilizado todo el nitrato). B: El porcentaje de nitrito que queda se calculó como nitrito detectado después de 5 h, que se indica como un porcentaje del nitrato utilizado en este punto de tiempo (100 % es = ningún nitrito se redujo más respecto a otros compuestos tales como óxido nítrico, 0 % = todo el nitrito se redujo más), teniendo en cuenta que la conversión de nitrato a nitrito es una reacción molar 1:1. D1P7, D1P10, D1P15A, D1P17, D3T4, D4P7, D4T4, D4T6, D4T9 y D5T11A: nombres de aislados seleccionados. D1P7*: la muestra de pH 7 de D1P7 se perdió. NO3R: nitrato reducido. NO2L: nitrito restante. Todos: las barras representan los promedios de todos los aislados con sus desviaciones típicas. *p < 0,05, ** p < 0,01 de acuerdo con una prueba de Wilcoxon en SPSS (v25).

FIG. 11: Mediciones de nitrato (A y E), nitrito (B y F), pH (C y G) y amonio (D y H) tras 5 h 30 min de biopelículas crecidas a partir de saliva con diferentes probióticos en ausencia (control: barras grises) o presencia (nitrato: barras negras) de nitrato 6,5 mM. El donante 1 (A-D) reduce el nitrato y tiene un pH salival más ácido, mientras que el donante 2 (E-H) no reduce el nitrato y tiene un pH salival neutro. Ninguno: no se añadió ningún probiótico. D1P7, D3T4, D4T4, D4T6, D4T9, D5T11: las biopelículas crecieron con uno de estos probióticos. Todos: el promedio de los diferentes probióticos con desviaciones típicas (*p < 0,05 entre las condiciones de control y nitrato de acuerdo con una prueba de Wilcoxon en SPSS v25). Cnt: mediciones en el medio de cultivo con (barras negras rayadas) o sin (barras grises rayadas) nitrato 6,5 mM. Cuando falta una barra negra o gris, la medición fue 0. NO3: Nitrato. NO2: Nitrito. Am: amonio. D5T11 en la FIG. 11 corresponde a D5T11A.

FIG. 12: Niveles de nitrato (A) y nitrito (B) en la saliva recogida por la mañana en dos donantes sanos en condiciones de ayunas tras la ingesta de una dosis de extracto de remolacha que contenía un 3 % de nitrato (Beta vulgaris) que contenía 220 mg de nitrato, que se disolvió en 200 ml de agua. El extracto de remolacha se tomó justo después de 0 h. Un donante (D1, buen reductor de nitrato, línea gris) parece reducir el nitrato del complemento, produciendo nitrito. El nitrato salival del otro donante (D25, mal reductor de nitrato, línea negra) no aumenta tanto y no se detecta nitrito, lo que indica una falta de reducción del nitrato. NO3: nitrato. NO2: nitrito. T: tiempo.

FIG. 13: Diferencias en la composición bacteriana de una biopelícula periodontal ex vivo en condiciones de nitrato (N) y de nitrato más probiótico (NP) en comparación con las biopelículas de control sin nitrato y sin probiótico (C). El probiótico añadido en la condición NP fue *Rothia aeria* D1P7 (CECT9999). Las gráficas de barras muestran el valor log2 de la relación [abundancia promedio en condiciones de nitrato]/[abundancia promedio en condiciones de control] de las biopelículas crecidas a partir de muestras subgingivales de 11 donantes con

enfermedad periodontal tras 7 horas de crecimiento anaeróbico. Se muestran los cambios en los Géneros (Paneles A y B) y las Especies (Paneles C y D), ordenados de bacterias más diferentes a menos diferentes entre las condiciones de nitrato y de control. Los géneros y especies con valores positivos son los que presentan niveles más altos tras el tratamiento con nitrato en relación con sus niveles en la condición de control (sin nitrato). Los géneros y especies con valores negativos son los que presentan niveles más bajos tras el tratamiento con nitrato en relación con sus niveles en la condición de control (sin nitrato). L(N/C): Log2(abundancia media de nitrato/abundancia media de control). L(NP/C): Log2(abundancia media de nitrato+probiótico/abundancia media de control).

NOMBRES DE GÉNEROS (A-Z)		NOMBRES DE ESPECIES (A-Z)	
Ag	= <i>Aggregatibacter</i>	Ag.NA	= <i>Aggregatibacter_NA</i>
Ca	= <i>Campylobacter</i>	Al.NA	= <i>Alloprevotella_NA</i>
Di	= <i>Dialister</i>	A.g	= <i>Anaeroglobus_geminatus</i>
Ei	= <i>Eikenella</i>	D.i	= <i>Dialister_invisus</i>
Fr	= <i>Fretibacterium</i>	E.c	= <i>Eikenella_corrodens</i>
Fuae	= <i>Fusobacteriaceae_NA</i>	E.NA	= <i>Eikenella_NA</i>
Fu	= <i>Fusobacterium</i>	F.fa	= <i>Fretibacterium_fastidiosum</i>
La	= <i>Lachnoanaerobaculum</i>	F.fe	= <i>Fretibacterium_feline</i>
Le	= <i>Leptotrichia</i>	Fr.NA	= <i>Fretibacterium_NA</i>
Or	= <i>Oribacterium</i>	Fuae.NA	= <i>Fusobacteriaceae_NA</i>
Pa	= <i>Parvimonas</i>	Fu.NA	= <i>Fusobacterium_NA</i>
Peae	= <i>Peptostreptococcaceae_NA</i>	F.n	= <i>Fusobacterium_nucleatum</i>
Pe	= <i>Peptostreptococcus</i>	L.NA	= <i>Leptotrichia_NA</i>
Po	= <i>Porphyromonas</i>	P.NA	= <i>Parvimonas_NA</i>
Pr	= <i>Prevotella</i>	P.s	= <i>Peptostreptococcus_stomatis</i>
Prae	= <i>Prevotellaceae_UCG-001</i>	P-g	= <i>Porphyromonas_gingivalis</i>
Ro	= <i>Rothia</i>	Po.NA	= <i>Porphyromonas_NA</i>
Se	= <i>Selenomonas</i>	P.d	= <i>Prevotella_dentalis</i>
Ta	= <i>Tannerella</i>	P.i	= <i>Prevotella_intermedia</i>
Tr	= <i>Treponema</i>	Pr.NA	= <i>Prevotella_NA</i>
		Pae.NA	= <i>Prevotellaceae_NA</i>
		R.NA	= <i>Rothia_NA</i>
		S.a	= <i>Selenomonas_artemidis</i>
		S.NA	= <i>Selenomonas_NA</i>
		S.s	= <i>Selenomonas_sputigena</i>
		T.f	= <i>Tannerella_forsythia</i>
		T.NA	= <i>Tannerella_NA</i>
		T.d	= <i>Treponema_denticola</i>
		T.m	= <i>Treponema_maltophilum</i>
		T.s	= <i>Treponema_socranskii</i>

FIG. 14: Capacidad de reducción de nitrato en muestras periodontales crecidas *ex vivo*. Las gráficas de barras muestran la cantidad de nitrato que queda (FIG. 14A) y de nitrito que se produce (FIG. 14B) por las biopelículas derivadas de las muestras periodontales ($n = 11$). Las biopelículas crecieron anaeróbicamente durante 7 horas en ausencia de nitrato (condición de control, C), en ausencia de nitrato pero con el aislado probiótico *Rothia* *aeria* D1P7 (condición de control+probiótico, CP), con nitrato 6,5 mM (condición de prebiótico nitrato, N), o con nitrato más el aislado probiótico *Rothia aeria* D1P7 (condición simbiótica de nitrato+probiótico, NP). La cantidad de nitrato añadida se indica con la barra Ctlr (250 mg/l). NO₃: nitrato; NO₂: nitrito. La FIG. 14C-F muestran las biopelículas crecidas durante 7 h a partir de muestras subgingivales de pacientes con periodontitis como inóculo en la condición de nitrato 5 mM (N, negro) y la condición de control con nitrato 0 mM (C, gris). FIG. 14C: las curvas de crecimiento promedio de todos los pacientes. Los valores presentados son los promedios de los 11 pacientes con sus correspondientes desviaciones típicas. FIG. 14D: las curvas de crecimiento individual del paciente 4. FIG. 14E: las curvas de crecimiento individual del paciente 5. FIG. 14F: las curvas de crecimiento individual del paciente 6. Los gráficos muestran la masa de la biopelícula, expresada como valores del índice celular (IC) a lo largo del tiempo (T) en horas (h), según indica el sistema xCELLigence, tras la normalización con medio ICC con nitrato 5 mM (para la condición N) o nitrato 0 mM (para la condición C). Las mediciones se tomaron cada 10 minutos, pero en la FIG. 14C, las barras de error con desviaciones típicas solo se muestran a intervalos de media hora para mayor claridad.

FIG. 15: Composición bacteriana en muestras de saliva recogidas después de 4 horas de ingestión de un complemento rico en nitrato (estudio 3: 4 h después de 220 mg de nitrato en ≥ 150 ml de ingesta, $n = 6$). La composición bacteriana se obtuvo mediante la secuenciación con Illumina del gen ARNr 16S. Las gráficas muestran la asignación de bacterias a nivel de género (panel A) y de especie (panel B). Los géneros y especies con valores positivos son los que se encuentran en niveles más altos tras la ingestión de nitrato en relación con 4 horas después del consumo de ≥ 150 ml de agua en un día de control (sin nitrato). Las bacterias están ordenadas de mayor diferencia a menor diferencia entre las muestras de 4 horas y el valor inicial. Log₂(N/C): Log₂(abundancia media de nitrato/abundancia media de control).

FIG. 15A:

Ne.NA	= <i>Neisseriaceae</i> Género no asignado
Ro	= <i>Rothia</i>
Ne	= <i>Neisseria</i>
Fr	= <i>Fretibacterium</i>
Tr	= <i>Treponema</i>
CS	= <i>Candidatus Saccharimonas</i>
Di	= <i>Dialister</i>
Se	= <i>Selenomonas</i>
Al	= <i>Alloprevotella</i>
La	= <i>Lactobacillus</i>
Pe	= <i>Peptostreptococcus</i>
Fu	= <i>Fusobacterium</i>
Ca	= <i>Campylobacter</i>
Pr	= <i>Prevotella</i>

FIG. 15B:

F.a	= <i>Filifactor alocis</i>
A.p	= <i>Atopobium parvulum</i>
P.d	= <i>Prevotella denticola</i>
Pr.NA	= <i>Prevotella</i> Especie no asignada
S.w	= <i>Scardovia wiggisiae</i>
T.f	= <i>Tannerella forsythia</i>
Pa.NA	= <i>Parvimonas</i> Especie no asignada
F.p	= <i>Fusobacterium periodonticum</i>
L.h	= <i>Leptotrichia hongkongensis</i>
V.NA	= <i>Veillonella</i> Especie no asignada
P.s	= <i>Peptostreptococcus stomatis</i>
T.d	= <i>Treponema denticola</i>
Saa.NA	= <i>Saccharimonadaceae</i> Especie no asignada
O.s	= <i>Oribacterium sinus</i>

Po	= <i>Porphyromonas</i>	C.NA	= <i>Campylobacter</i> Especie no asignada
Ve	= <i>Veillonella</i>	F.n	= <i>Fusobacterium nucleatum</i>
Or	= <i>Oribacterium</i>	Se.NA =	= <i>Selenomonas</i> Especie no asignada
Pa	= <i>Parvimonas</i>	Fu.NA	= <i>Fusobacterium</i> Especie no asignada
At	= <i>Atopobium</i>	O.NA	= <i>Oribacterium</i> Especie no asignada
		A.t	= <i>Alloprevotella tannerae</i>
		L.NA	= <i>Lactobacillus</i> Especie no asignada
		A.NA	= <i>Alloprevotella</i> Especie no asignada
		D.i	= <i>Dialister invisus</i>
		L.w	= <i>Leptotrichia wadei</i>
		C.g	= <i>Campylobacter gracilis</i>
		CS.Na	= <i>Candidatus Saccharimonas</i> Especie no asignada
		T.NA	= <i>Treponema</i> Especie no asignada
		S.s	= <i>Selenomonas sputigena</i>
		Fr.NA	= <i>Fretibacterium</i> Especie no asignada
		P.n	= <i>Prevotella nigrescens</i>
		F.f	= <i>Fretibacterium fastidiosum</i>
		N.NA	= <i>Neisseria</i> Especie no asignada
		R.m	= <i>Rothia mucilaginosa</i>
		R.d	= <i>Rothia dentocariosa</i>
		R.Na	= <i>Rothia</i> Especie no asignada

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Composición que comprende nitrato para su uso en la reducción o la prevención de la disbiosis bucal y/o el aumento de la eubiosis bucal

5 Las principales características de la invención ya se han explicado en las secciones anteriores de Sumario de la invención y Definiciones.

Como se ha tratado, la composición de la invención no solo reduce la disbiosis bucal, sino que también aumenta la eubiosis bucal, lo que puede considerarse como una gran aportación a la técnica.

Las bacterias asociadas a la salud en las biopelículas bucales son *Neisseria*, *Rothia* y *Kingella*.

10 Las bacterias asociadas a la caries en las biopelículas bucales son *Streptococcus*, *Veillonella*, *Oribacterium* y *Atopobium*.

Las bacterias asociadas a las enfermedades periodontales/halitosis en las biopelículas bucales son *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella*, *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, y *Solobacterium*.

Las bacterias clásicas asociadas a la periodontitis incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sin embargo, en una reciente revisión sistemática, otras 17 especies se asociaron a la enfermedad, incluyendo (otras) especies de los géneros *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Dialister*,
 5 *Peptostreptococcus*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Prevotella*.

Porphyromonas, *Fusobacterium*, *Leptotrichia* y *Prevotella* también se asocian a la halitosis, mal aliento resultante de la producción microbiana de compuestos sulfúricos volátiles (CSVs). De manera adicional, un biomarcador clásico de la halitosis es *Solobacterium moorei* que produce CSV, que también se ha asociado a la periodontitis.

10 Como se trata en las secciones "Resultados y Conclusiones" del EJEMPLO 1 práctico en el presente documento, los inventores realizaron un estudio *ex vivo* para analizar los efectos del nitrato en el crecimiento de una biopelícula bucal e identificaron, p. ej., que después de un tratamiento "agudo" (5 h y 9 h después de la adición de nitrato), el nitrato administrado:

- aumenta la cantidad de al menos una bacteria asociada a la salud de las biopelículas bucales
 15 seleccionada del grupo que consiste en *Neisseria*, *Rothia* y *Kingella* en las biopelículas bucales, y/o

- disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a la caries de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus*, *Veillonella*, *Oribacterium* y *Atopobium* en las biopelículas bucales, y/o

- disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a enfermedades periodontales/halitosis de las
 20 biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella*, *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, y *Solobacterium* en las biopelículas bucales.

Por tanto, en una realización particular, el nitrato administrado aumenta la cantidad de al menos una bacteria asociada a la salud de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Neisseria*, *Rothia*
 25 y *Kingella* en las biopelículas bucales, aumentando de este modo la eubiosis bucal. El aumento de la cantidad de estas bacterias es beneficioso para todas las enfermedades bucales. Es la primera vez que se demuestra que un compuesto aumenta los niveles de bacterias asociadas a la salud en varias veces ya después de 5 h. Esta es una propiedad única del nitrato y no se ha demostrado antes para ningún otro compuesto.

En una realización más particular, el nitrato administrado aumenta la cantidad de al menos una bacteria
 30 asociada a la salud de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Neisseria* y *Rothia* en las biopelículas bucales. Más particularmente, el nitrato administrado aumenta la cantidad de bacterias *Neisseria* y *Rothia* en las biopelículas bucales.

En una realización particular, el nitrato administrado disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a la caries de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus*, *Veillonella*,
 35 *Oribacterium* y *Atopobium* en las biopelículas bucales. Es la primera vez que se demuestra que un compuesto disminuye todas estas bacterias asociadas a la caries junto con su metabolito lactato (el principal ácido implicado en el desarrollo de la caries), lo que demuestra un fuerte potencial anticariogénico del nitrato. De manera adicional,

resulta sorprendente que esto ocurra tras una única dosis de nitrato <24 h.

En una realización más particular, el nitrato administrado disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a la caries de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus*, *Veillonella*, y *Oribacterium* en las biopelículas bucales. Más particularmente, el nitrato administrado disminuye la cantidad de bacterias *Streptococcus*, *Veillonella* y *Oribacterium* y más particularmente también de bacterias *Atopobium* en las biopelículas bucales. De manera notable, esta lista incluye no solo las bacterias clásicamente asociadas a la caries, sino también otras bacterias más raras o recientemente relacionadas con la enfermedad con el uso de técnicas modernas de secuenciación, p. ej., *Oribacterium* y *Atopobium*.

En otra realización, el nitrato administrado disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a enfermedades periodontales/halitosis de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella*, *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, y *Solobacterium* en las biopelículas bucales. De manera notable, esta lista incluye no solo las bacterias clásicamente asociadas a las bacterias del complejo rojo similares a la periodontitis (*Porphyromonas*, *Treponema*, y *Tannerella*) sino también otras bacterias más recientemente relacionadas con la enfermedad con el uso de técnicas modernas de secuenciación, p. ej., *Eubacterium* y *Alloprevotella*. Es la primera vez que se demuestra que un compuesto disminuye todas estas bacterias asociadas a las enfermedades periodontales y a la halitosis de forma conjunta, lo que demuestra un fuerte potencial prebiótico del nitrato contra estas enfermedades. Esta es una propiedad única del nitrato y no se ha demostrado antes para ningún otro compuesto. Es más, es la primera vez que diferentes bacterias asociadas a la caries y asociadas a la periodontitis disminuyen al mismo tiempo. A la luz de esto, es la primera vez que cualquier compuesto disminuye las bacterias periopatógenas, al tiempo que aumenta el amonio y disminuye el lactato. Por último, resulta sorprendente que todo esto ocurra tras una única dosis de nitrato <24 h.

En una realización más particular, el nitrato administrado disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a enfermedades periodontales/halitosis de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella* y *Alloprevotella* en las biopelículas bucales. Más particularmente, el nitrato administrado disminuye la cantidad de bacterias *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella* y *Alloprevotella* y más particularmente también de una o más de las bacterias *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, y *Solobacterium* en las biopelículas bucales.

En una realización particular, el nitrato administrado:

- aumenta la cantidad de al menos una bacteria asociada a la salud de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Neisseria*, *Rothia* y *Kingella* en las biopelículas bucales, y

- disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a la caries de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus*, *Veillonella*, *Oribacterium* y *Atopobium* en las biopelículas bucales, y

- disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a enfermedades periodontales/halitosis de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*,

Prevotella, *Treponema*, *Tannerella*, *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, y *Solobacterium* en las biopelículas bucales.

Como se ha tratado, la administración de nitrato cambia la composición bacteriana de las biopelículas bucales, pero también las funciones. Por tanto, como se ve en el EJEMPLO 1, en realizaciones particulares:

5 1) El nitrato administrado disminuye la producción de lactato y aumenta el nivel de amonio en las biopelículas bucales, lo que es relevante para prevenir y tratar el desarrollo de la caries;

2) El nitrato administrado reduce los compuestos sulfúricos volátiles (CSVs) y las bacterias productoras de CSVs implicadas en la halitosis y la periodontitis;

3) De manera impresionante, aunque el amonio aumenta, las bacterias asociadas a las enfermedades periodontales/a la halitosis disminuyen, mientras que tienen semejanza con un pH neutro o ligeramente alcalino. Por eso se puede decir que el nitrato estimula una composición simbiótica general, y no previene una enfermedad mientras que impulsa otra enfermedad (que es el caso del uso de la arginina);

4) El nitrato administrado aumenta la producción de nitrito, lo cual es relevante para las afecciones y estados sistémicos que se benefician del aumento de los niveles de óxido nítrico sistémico;

15 5) El nitrato administrado aumenta la capacidad de reducción de nitrato de la microbiota bucal, al aumentar las bacterias de reducción de nitrato asociadas a la salud bucal; y/o

6) El nitrato administrado disminuye las bacterias (p. ej., *Porphyromonas*, *Treponema*, *Tannerella*) que desencadenan la inflamación gingival y aumenta las bacterias (p. ej., *Rothia* y *Neisseria*) que reducen la inflamación gingival.

20 En cuanto al punto (2), los CSVs tales como el sulfuro de hidrógeno (H₂S) y el metilmercaptano (CH₃SH), por un lado, son la causa directa de la halitosis y, por otro lado, dañan el tejido periodontal en la periodontitis, puesto que estos gases, aparte de oler mal, son genotóxicos y causan inflamación. Por ello, existe una clara correlación entre la halitosis y la periodontitis. Como se trata en el EJEMPLO 1, el nitrato reduce las bacterias que producen estos gases. Aparte de esto, el nitrato cambia el metabolismo de la comunidad microbiana, puesto que las bacterias pueden usar sulfato o nitrato y el nitrato da más energía que el sulfato. En otras palabras, el nitrato se ve favorecido cuando está presente y al observar la reducción del nitrato de una comunidad bacteriana, al igual que en el EJEMPLO 1, se puede concluir que se inhibe la reducción del sulfato a H₂S, que algunas bacterias convierten en CH₃SH. Por lo tanto, los productos finales de la reducción de sulfato, H₂S y CH₃SH (malolientes y tóxicos) están siendo sustituidos por óxido nítrico (antimicrobiano y beneficioso). En cuanto a las bacterias, la administración de nitrato da una ventaja a las bacterias de reducción de nitrato y/o resistentes al óxido nítrico y una desventaja a las que reducen el sulfato y/o que son sensibles al óxido nítrico. Resumiendo, los resultados del EJEMPLO 1 muestran que hay una variación importante de las bacterias y el metabolismo asociados a la halitosis y a la periodontitis hacia las bacterias y el metabolismo asociados a la salud.

35 Por tanto, en una realización particular, la composición que comprende nitrato se usa como prebiótico para disminuir las bacterias productoras de CSV y la producción de CSV.

Los efectos del nitrato en el cambio de la composición bacteriana y las funciones de las biopelículas bucales pueden analizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Un método adecuado es el descrito

en el EJEMPLO 1.

En una realización, la enfermedad bucal mediada por biopelículas es la caries y el nitrato administrado disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a la caries seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus*, *Veillonella*, *Oribacterium* y *Atopobium* en las biopelículas bucales.

5 En una realización, la enfermedad bucal mediada por biopelículas es una bacteria asociada a enfermedades periodontales/halitosis de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella*, *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, y *Solobacterium* en las biopelículas bucales.

10 Una realización se refiere a la composición que comprende nitrato proporcionada en el presente documento para su uso en la reducción de la cantidad de biopelículas (es decir, la placa dental o la masa de recubrimiento lingual), consiguiendo de este modo un tratamiento o prevención agudos con efectos antes de 24 horas de una enfermedad bucal mediada por biopelículas, y donde la composición es administrada por vía oral al mamífero y aumenta de este modo la concentración de nitrato en la saliva de la boca. El efecto de este tipo se ha
15 demostrado, p. ej., en el EJEMPLO 6.

En una realización, el mamífero es un ser humano. En otra realización, el mamífero es un animal tal como un gato, un perro, un caballo, una vaca, un cerdo, una cabra, una oveja, un burro, un búfalo, un buey, una llama o un camello. En otra realización, la enfermedad bucal mediada por biopelículas es una enfermedad periodontal o halitosis.

20 Bacterias probióticas para aumentar la capacidad de reducción de nitrato de un mamífero

En el EJEMPLO 3, se demuestra que los individuos tienen diferentes capacidades de reducción de nitrato (CRN, es decir, la capacidad de su microbiota bucal para reducir el nitrato en nitrito) y se obtiene evidencia *in vitro* de que esta capacidad puede estimularse con probióticos de reducción de nitrato. Es más, los inventores han identificado bacterias particulares con características beneficiosas para ser usadas como probióticos, p. ej., en
25 individuos con capacidad deficiente de reducción de nitrato. Incluso en un individuo con una CRN baja a indetectable, la adición de probióticos de reducción de nitrato dio lugar a una CRN significativa *in vitro*.

Dependiendo de la CRN de cada individuo, la composición a administrar comprenderá nitrato sin bacterias probióticas, bacterias probióticas sin nitrato o nitrato y bacterias probióticas. Por tanto, como se ha tratado anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende nitrato y/o una cepa
30 bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia*, *Neisseria* o *Kingella*, para su uso en el aumento de la capacidad de reducción de nitrato de un mamífero, mediante el aumento agudo de la cantidad de bacterias de reducción de nitrato en las biopelículas bucales, consiguiendo de este modo un tratamiento o prevención de enfermedades bucales que se benefician de la reducción de nitrato (caries, enfermedades periodontales y halitosis), y una enfermedad o estado que se beneficia de un aumento de los niveles de óxido nítrico sistémico.

35 Se cree que no existe una técnica anterior que informe sobre probióticos de reducción de nitrato capaces de restaurar o mejorar la CRN de un individuo. Los inventores han identificado bacterias particulares con capacidades relevantes de reducción de nitrato en diferentes afecciones y con otras características relevantes para

ser usadas como probióticos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una cepa bacteriana que tiene las siguientes propiedades:

a) reduce el 100 % de nitrato tras 7 h de incubación a 37 °C partiendo de una densidad óptica (DO) de 0,01 en medio ICC con nitrato 6,5 mM;

5 b) reduce más del 15 % de nitrato tras 4 h de incubación a 37 °C partiendo de una DO de 0,01 en medio ICC con nitrato 6,5 mM;

c) no disminuye el pH del medio ICC con nitrato 6,5 mM tras 7 h de incubación a 37 °C partiendo de una DO de 0,01 por debajo de un pH 6,8;

d) crece hasta alcanzar una densidad óptica superior a 0,7 tras 7 h de crecimiento en medio ICC con nitrato 6,5 mM a 37 °C partiendo de una densidad óptica DO de 0,01; y

e) es capaz de colonizar una biopelícula bucal *in vitro* crecida a partir de saliva humana durante 5 h a 37 °C cuando se añade 1:1 de cepa bacteriana en ICC (DO 0,40):inóculo de saliva, alcanzando una proporción superior al 10 % de las bacterias totales en la biopelícula formada. Los detalles de las etapas descritas anteriormente se encuentran en el EJEMPLO 3 sección 21-25.

15 Se entiende que la cepa bacteriana es una cepa bacteriana aislada. Tal como lo entiende el experto en la materia en el presente contexto, el término "aislado" se refiere a que la cepa bacteriana se ha aislado de su entorno natural, es decir, no está presente en su entorno natural, por lo que está libre de otros organismos y sustancias presentes en el entorno natural.

En una realización particular, la cepa bacteriana pertenece al género *Rothia* y tiene las características mencionadas anteriormente (a)-(e). En otras realizaciones, la cepa bacteriana pertenece a *Rothia aeria*, *Rothia dentocariosa*, y *Rothia mucilaginosa*.

Basándose en los ensayos descritos anteriormente (etapas (a)-(e)) y, p. ej., en el EJEMPLO 3, el experto en la materia es capaz de repetir rutinariamente el ensayo para determinar objetivamente si una cepa particular está abarcada en la presente invención. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método de 25 identificación selectiva de bacterias con capacidad de reducción de nitrato, comprendiendo el método las etapas mencionadas anteriormente (a)-(e).

A través de los Ejemplos, se proporcionan diferentes cepas que cumplen con las características mencionadas anteriormente. Además de dichas cepas, mediante el método descrito en detalle, es plausible identificar y aislar otras cepas dentro de un agrupamiento de bacterias, con las mismas características. También se demuestra mediante los Ejemplos, que estas características son beneficiosas para los fines de la invención. Por tanto, aunque se han analizado e identificado algunas cepas específicas con estas características beneficiosas, no hay razón para limitar el alcance de la invención a dichas cepas puesto que todas las etapas del método para obtener otras cepas buenas se describen de forma plausible en el presente documento. Por lo tanto, la invención también proporciona un agrupamiento de cepas distintas de las usadas en los Ejemplos que tienen las mismas 35 características. Es importante señalar que no todas las cepas bacterianas tendrán las características mencionadas; por tanto, la invención proporciona un método para reconocerlas. De forma análoga, es pertinente señalar que el método descrito anteriormente no limita el alcance de la invención. El ensayo es uno adecuado para analizar las

características deseadas.

Se aislaron cepas bacterianas particulares de sujetos donantes sin caries ni periodontitis. Las muestras de placa o de recubrimiento lingual fueron recogidas por un dentista y resuspendidas en 1 ml de PBS. La identificación a nivel de especie se realizó mediante la secuenciación del gen ARNr 16S como se describe en el EJEMPLO 3 sección 23.

Las cepas se depositaron ante la Colección Española de Cultivos Tipo (Universitat de Valencia, Campus de Burjassot, Edit, de Investigation, 46100 Burjassot, Valencia, España) el 23 de octubre de 2019 (23.10.2019). Las cepas depositadas son viables y mantienen todas sus características relacionadas con su depósito.

En realizaciones particulares, la cepa bacteriana es una seleccionada del grupo que consiste en:

- *Rothia aeria* depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 9999 (código interno D1P7). Su secuencia de ARNr 16S corresponde a la SEQ ID NO: 1, y al compararla con bases de datos públicas, muestra una identidad nucleotídica del 99,72 % con *Rothia aeria* A1-17B.

- *Rothia dentocariosa* depositada como CECT 30000 (código interno D1P17). Su secuencia de ARNr 16S corresponde a la SEQ ID NO: 2, y al compararla con bases de datos públicas, muestra una identidad nucleotídica del 99,87 % con *Rothia dentocariosa* ATCC 17931.

- *Rothia mucilaginosa* depositada como CECT 30001 (código interno D3T4). Su secuencia de ARNr 16S corresponde a la SEQ ID NO: 3, y al compararla con bases de datos públicas, muestra una identidad nucleotídica del 99,07 % con *Rothia mucilaginosa* DSM 20746.

- *Rothia mucilaginosa* depositada como CECT 30002 (código interno D4T4). Su secuencia de ARNr 16S corresponde a la SEQ ID NO: 4, y al compararla con bases de datos públicas, muestra una identidad nucleotídica del 99,20 % con *Rothia mucilaginosa* DSM 20746.

- *Rothia mucilaginosa* depositada como CECT 30003 (código interno D4T6). Su secuencia de ARNr 16S corresponde a la SEQ ID NO: 5, y al compararla con bases de datos públicas, muestra una identidad nucleotídica del 99,20 % con *Rothia mucilaginosa* DSM 20746.

- *Rothia mucilaginosa* depositada como CECT 30004 (código interno D4T9). Su secuencia de ARNr 16S corresponde a la SEQ ID NO: 6, y al compararla con bases de datos públicas, muestra una identidad nucleotídica del 99,20 % con *Rothia mucilaginosa* DSM 20746.

- *Rothia mucilaginosa* depositada como CECT 30005 (código interno D5T11A). Su secuencia de ARNr 16S corresponde a la SEQ ID NO: 7, y al compararla con bases de datos públicas, muestra una identidad nucleotídica del 99,07 % con *Rothia mucilaginosa* DSM 20746.

Las cepas mencionadas fueron aisladas de la cavidad bucal (P = placa dental, L = lengua, como se indica en el código interno D-Número-(P o L)-Número) en individuos sanos, sin caries dental, enfermedades de las encías ni halitosis, con presión arterial saludable y sin alteraciones visibles de la mucosa bucal.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en una cepa depositada ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 9999, CECT 30000, CECT 30001, CECT 30002, CECT 30003, CECT 30004, CECT 30005 o combinaciones de la misma. En una realización particular, la composición comprende de 10^4 a 10^{13}

ufc/g de células de al menos una de las cepas bacterianas mencionadas. Las composiciones de la presente invención pueden comprender una sola cepa o ser una combinación de diferentes cepas bacterianas.

Resulta evidente que, al usar las cepas depositadas como material de partida, el experto en la materia puede, de forma rutinaria, por mutagénesis convencional o técnicas de reislamiento, obtener variantes o mutantes adicionales de las mismas que conservan o potencian las características y ventajas relevantes descritas en el presente documento de las cepas que forman la composición de la invención. Por tanto, la invención también se refiere a las variantes de las cepas divulgadas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "variante" o "mutante" de una cepa se refiere a cualquier cepa de origen natural o específicamente desarrollada obtenida a partir de la cepa de referencia X, principalmente por mutación, que mantiene las características mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el gen de ARNr 16S de una cepa "variante", como se contempla en el presente documento, puede compartir, p. ej., aproximadamente el 85 por ciento, el 86 por ciento, el 87 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento o el 99 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 7 de una cepa divulgada en el presente documento. En una realización particular, los mutantes se obtienen usando la tecnología de ADN recombinante. En otra realización, los mutantes se obtienen mediante mutagénesis aleatoria. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener un mutante de una cepa depositada, donde el método comprende usar la cepa depositada como material de partida y aplicar mutagénesis, y donde la variante o mutante obtenido conserva o potencia además al menos las características de la cepa depositada.

En una realización particular, las cepas han sido fermentadas en un medio artificial y sometidas a un postratamiento después de la fermentación, para obtener células bacterianas, y las células bacterianas resultantes están en un medio líquido o en una forma sólida. Particularmente, el postratamiento se selecciona del grupo que consiste en: secado, congelación, liofilización, secado por lecho fluido, secado por pulverización y refrigeración en medio líquido, y más particularmente, se trata de la liofilización.

Las cepas de la invención se producen cultivando las bacterias en un medio artificial adecuado y en condiciones adecuadas. Por la expresión "medio artificial" para microorganismos debe entenderse un medio que contenga sustancias naturales, y opcionalmente sustancias químicas sintéticas tales como el polímero alcohol polivinílico, que pueda reproducir algunas de las funciones de los sueros. Los medios artificiales adecuados comunes son caldos nutritivos que contienen los elementos que incluyen una fuente de carbono (p. ej., glucosa), una fuente de nitrógeno (p. ej., aminoácidos y proteínas), agua y sales necesarias para el crecimiento bacteriano. Los medios de crecimiento pueden tener forma líquida o, a menudo, estar mezclados con agar u otro agente gelificante para obtener un medio sólido. Las cepas pueden cultivarse solas para formar un cultivo puro, o como un cultivo mixto junto con otros microorganismos, o cultivando bacterias de diferentes tipos por separado y combinándolas después en las proporciones deseadas. Después de la cultivación, y dependiendo de la formulación final, las cepas pueden usarse como bacterias purificadas, o de forma alternativa, puede usarse el cultivo bacteriano o la suspensión celular, ya sea como tal o después de un postratamiento adecuado. En esta descripción, se entiende el término "biomasa" como el cultivo de cepas bacterianas obtenido tras su cultivación.

Por el término "postratamiento" debe entenderse, en el contexto de la presente invención, cualquier procesamiento llevado a cabo sobre la biomasa con el objetivo de obtener células bacterianas almacenables. El objetivo del postratamiento es disminuir la actividad metabólica de las células en la biomasa, y por tanto, reducir la tasa de las reacciones perjudiciales celulares. Como resultado del postratamiento, las células bacterianas pueden estar en forma sólida o líquida. En forma sólida, las células bacterianas almacenadas pueden ser un polvo o gránulos. En cualquier caso, tanto las formas sólidas como las líquidas que contienen las células bacterianas no están presentes en la naturaleza, en consecuencia de esto, no son de origen natural, ya que son el resultado de proceso(s) artificial(es) de postratamiento. Los procesos de postratamiento pueden requerir en realizaciones particulares el uso de uno o más de los llamados agentes de postratamiento. En el contexto de la presente invención, la expresión "agente de postratamiento" se refiere a un compuesto usado para realizar los procesos de postratamiento descritos en el presente documento. Entre los agentes de postratamiento deben incluirse, sin limitación, agentes deshidratantes, agentes bacteriostáticos, agentes crioprotectores (crioprotectores), cargas inertes (también conocidas como lioprotectores), material portador (también conocido como material de núcleo), etc., ya sea usados solos o en combinación.

Existen dos enfoques básicos para disminuir la actividad metabólica de las células bacterianas y, por tanto, dos enfoques para llevar a cabo el postratamiento. El primero consiste en disminuir la tasa de todas las reacciones químicas, lo que puede hacerse bajando la temperatura mediante refrigeración o congelación usando refrigeradores, congeladores mecánicos y congeladores de nitrógeno líquido. De forma alternativa, la disminución de la tasa de todas las reacciones químicas puede lograrse añadiendo sustancias que inhiben el crecimiento de las células bacterianas, a saber, un agente bacteriostático, abreviado Bstatic.

El segundo enfoque para llevar a cabo el postratamiento es eliminar el agua de la biomasa, un proceso que puede implicar la sublimación del agua usando un liofilizador. Las técnicas adecuadas para eliminar el agua de la biomasa son secado, liofilización, secado por pulverización o secado por lecho fluido. Los postratamientos que dan lugar a una forma sólida pueden ser secado, congelación, liofilización, secado por lecho fluido o secado por pulverización.

El postratamiento es preferentemente liofilización, que implica la eliminación del agua de las suspensiones bacterianas congeladas por sublimación a presión reducida. Este proceso consiste en tres etapas: la precongelación del producto para formar una estructura congelada, el secado primario para eliminar la mayor parte del agua y el secado secundario para eliminar el agua ligada. Debido a la variabilidad objetiva y esperada de los procesos industriales de fabricación y aislamiento de los cultivos bacterianos liofilizados, estos últimos contienen habitualmente cierta cantidad de carga inerte también conocida como lioprotector. Su función es normalizar el contenido de bacterias probióticas vivas en el producto. En los cultivos liofilizados disponibles en el mercado se usan las siguientes cargas inertes: sucrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, glucosa, maltosa, maltodextrina, almidón de maíz, inulina y otras cargas no higroscópicas farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente, también se usan otros agentes estabilizadores o protectores de la congelación como el ácido ascórbico, para formar una pasta viscosa, que se somete a liofilización. En cualquier caso, el material así obtenido puede triturarse hasta alcanzar el tamaño adecuado, incluso hasta convertirse en polvo.

Las cepas que forman la composición de la invención están preferentemente en forma de células viables. Sin embargo, las cepas de la invención también pueden estar en forma de células no viables, tales como cultivos destruidos o composiciones que contengan factores beneficiosos (tales como enzimas y péptidos antibacterianos) producidos por las cepas identificadas en el presente documento. Esto podría incluir microorganismos destruidos
 5 térmicamente o microorganismos destruidos por exposición a un pH alterado, tratamiento por ultrasonidos, radiación o sometimiento a presión. Con las células no viables, la preparación del producto es más sencilla, las células pueden incorporarse fácilmente a los productos comerciales y los requisitos de almacenamiento son mucho menos limitados que los de las células viables.

Usos médicos/de cuidado bucal de las composiciones de la invención

Como se ha dicho, el primer aspecto de la invención se refiere a las composiciones que comprenden nitrato (y particularmente pueden comprender también bacterias probióticas) para su uso en la reducción o la prevención de la disbiosis bucal y/o el aumento de la eubiosis bucal, cambiando la composición bacteriana y las funciones de la misma de biopelículas bucales en un mamífero, disminuyendo la cantidad de bacterias asociadas a una enfermedad y funciones bacterianas aumentando la cantidad de bacterias asociadas a la salud y funciones
 15 bacterianas, consiguiendo de este modo un tratamiento o prevención agudos con efectos antes de 24 horas de una enfermedad bucal mediada por biopelículas, y donde la composición es administrada por vía oral al mamífero y aumenta de este modo la concentración de nitrato en la saliva de la boca. De forma alternativa, este aspecto puede formularse como el uso de una composición de la invención para la fabricación de un medicamento para reducir o prevenir la disbiosis bucal y/o aumentar la eubiosis bucal en los términos descritos anteriormente.
 20 También como alternativa, la invención proporciona un método para reducir o prevenir la disbiosis bucal y/o aumentar la eubiosis bucal en los términos descritos anteriormente en un mamífero, incluyendo un ser humano, que comprende administrar a dicho mamífero que lo necesite la composición definida.

En una realización particular, la enfermedad bucal mediada por biopelículas se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad periodontal, halitosis y caries.

Las enfermedades periodontales, también conocidas como enfermedades de las encías, son un conjunto de afecciones inflamatorias que afectan a los tejidos que rodean los dientes. En su fase temprana, denominada gingivitis, las encías se inflaman, se enrojecen y pueden sangrar. En su forma más grave, denominada periodontitis, se pierde el tejido del huésped como consecuencia de la inflamación destructiva y la actividad proteolítica de la microbiota disbiótica. Debido a la actividad proteolítica de las bacterias que metabolizan las
 30 proteínas del líquido crevicular gingival y los productos de descomposición de los tejidos, el pH se mantiene neutro o ligeramente alcalino. En la periodontitis, las encías pueden separarse del diente, se puede perder hueso y los dientes pueden aflojarse o caerse. También puede producirse mal aliento. Cuando esta enfermedad está asociada a un implante se llama periimplantitis, en la que la pérdida de hueso tiende a desarrollarse más rápidamente.

Más particularmente, la enfermedad periodontal se selecciona del grupo que consiste en periodontitis, gingivitis y periimplantitis.

En una realización particular, la enfermedad bucal mediada por biopelículas es halitosis. Esta enfermedad causa un aliento fuerte notoriamente desagradable. La halitosis es intraoral en el 90 % de los casos y está causada

principalmente por cambios en la composición y la actividad de la microbiota lingual, lo que conduce a una disbiosis microbiana. Este estado disbiótico causa un aumento de la actividad proteolítica y/o de la degradación bacteriana de los aminoácidos que contienen azufre, lo que da lugar a la producción de compuestos sulfúricos volátiles, tales como sulfuro de hidrógeno (H₂S), metilmercaptano y, en menor medida, dimetilsulfuro. Debido a la actividad proteolítica, el pH se mantiene neutro o aumenta ligeramente. De manera adicional, se neutraliza una menor cantidad de CSVs por el metabolismo de una comunidad lingual disbiótica, que contribuye a la liberación de CSVs y al mal aliento.

En una realización particular, la enfermedad bucal mediada por biopelículas es caries. Debido a la actividad sacarolítica (es decir, el metabolismo microbiano de los carbohidratos, principalmente azúcares), se produce lactato y el pH disminuye. Cuando el pH disminuye por debajo de un nivel crítico de alrededor de un pH 5,5, el esmalte se desmineraliza y puede desarrollarse caries.

En una realización, el mamífero es un ser humano. En otra realización, el mamífero es un animal tal como un gato, un perro, un caballo, una vaca, un cerdo, una cabra, una oveja, un burro, un búfalo, un buey, una llama o un camello. En otra realización, la enfermedad bucal mediada por biopelículas es una enfermedad periodontal o halitosis.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden al menos una cepa bacteriana definida anteriormente. Particularmente, dichas composiciones están destinadas para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad bucal mediada por biopelículas, tal como enfermedades periodontales, halitosis y caries. Las cepas bacterianas de *Rothia* identificadas mejoran la resiliencia frente a diferentes enfermedades bucales mediadas por biopelículas, ya que presentan CRN en condiciones muy diferentes asociadas a diferentes enfermedades (p. ej., la caries tiene un pH ácido, mientras que la periodontitis tiene un pH neutro a ligeramente alcalino). Por ejemplo, los aislados identificados reducen el nitrato a cualquier pH. Por tanto, cada cepa es útil para tratar o prevenir la caries, una enfermedad periodontal y la halitosis al mismo tiempo. Por lo tanto, un producto que comprenda una de las cepas identificadas es útil para tratar o prevenir cualquier enfermedad mediada por biopelículas. De manera adicional, la reducción de nitrato por parte de la microbiota bucal aumenta la cantidad de niveles de óxido nítrico sistémico y, por tanto, cada cepa es útil para prevenir afecciones sistémicas que se benefician del óxido nítrico.

Sin embargo, los inventores han visto que algunas cepas bacterianas funcionan mucho mejor (es decir, tienen una "superCRN") en condiciones particulares y, por tanto, son particularmente buenas para una enfermedad específica (véase la Tabla 3 del EJEMPLO 3). Por tanto, en realizaciones particulares:

- Las cepas bacterianas D1P7/CECT9999, D4T4/CECT30002, D4T6/CECT30003, y D4T9/CECT3004, tienen una buena CRN (es decir, por encima de la media) a pH 6, por lo tanto son particularmente adecuadas para el tratamiento de la caries.

- Las cepas bacterianas D1P7/CECT9999, D3T4/CECT30001, y D4T9/CECT3004 tienen una buena CRN (es decir, por encima de la media) a pH 7,5 y también reducen bien el nitrito a este pH, por lo tanto son particularmente adecuadas para el tratamiento de las enfermedades periodontales y la halitosis.

- Las cepas bacterianas D1P17/CECT30000, D3T4/CECT30001, D4T4/CECT30002, D4T6/CECT30003

y D5T11A/CECT30005 producen la mayoría de los nitritos (es decir, por encima de la media) en todos o en 2 de los 3 niveles de pH analizados (es decir, pH 6, pH 7 y/o pH 7,5), por lo tanto son particularmente adecuadas para el tratamiento de afecciones o estados sistémicos que se benefician del óxido nítrico, ya que el nitrito puede deglutirse para aumentar los niveles de óxido nítrico sistémico.

5 Las cepas bacterianas de *Rothia* identificadas son útiles para mejorar la CRN de un individuo y, por tanto, son útiles en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado que se beneficia del suministro de óxido nítrico que no sea una enfermedad bucal mediada por biopelículas. En realizaciones particulares, las cepas identificadas son útiles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, diabetes, disfunción eréctil, infección del tracto urinario, rendimiento deportivo mejorado, mejora/aumento de la actividad antimicrobiana del estómago, mejora/aumento de la actividad antimicrobiana de los macrófagos. Particularmente, la enfermedad cardiovascular es hipertensión, por lo que las cepas identificadas reducen la presión arterial. Las cepas identificadas también mejoran la función endotelial.

Composiciones aplicadas tópicamente (efecto directo) y composiciones ingeridas (efecto indirecto)

15 Como entiende el experto en la materia en el presente contexto, si la composición es una composición aplicada tópicamente (es decir, su uso está destinado en la cavidad bucal, realizando por tanto un "efecto directo", tal como el caso de una pasta de dientes) que comprende en el presente documento una cantidad relevante de nitrato, entonces el uso de la composición cumple automáticamente/inherentemente los requisitos del primer aspecto; es decir, la pasta de dientes es una composición que se disuelve y/o desintegra en la boca y, de este modo, aumenta la concentración de nitrato en la saliva de la boca debido a la presencia del nitrato en la composición como tal. Lo mismo ocurre, por ejemplo, si la composición es, p. ej., un colutorio, un zumo o un gel adecuado (p. ej., un gel de nitrato para las bolsas periodontales).

20 Por otro lado, la composición puede ser una composición ingerida, p. ej., un comprimido con recubrimiento entérico que casi no se disuelve/desintegra antes de pasar al entorno gástrico. También en este caso, se entiende que dicha composición de comprimido con recubrimiento entérico sería una composición dentro del ámbito del primer aspecto, ya que es una composición que aumenta de este modo la concentración de nitrato en la saliva de la boca debido a la actividad de reciclaje de nitrato de las glándulas salivales. Esto puede denominarse "efecto indirecto".

Por lo tanto, en una realización particular, la composición es una composición aplicada tópicamente seleccionada del grupo que consiste en:

- 30 - una pasta de dientes;
- un colutorio;
- un gel bucal;
- hilo dental;
- una pasta para la lengua;
- 35 - un extracto alimenticio;
- una goma de mascar;
- un comprimido masticable; y

- un polvo de complemento; o

la composición es una composición ingerida seleccionada del grupo que consiste en:

- comprimidos, píldoras o cápsulas;

- un extracto alimenticio;

5 - una goma de mascar;

- un comprimido masticable;

- un alimento o snack para mascotas y ganado;

- productos que contienen almidón y azúcar;

- un polvo de complemento; y

10 - nutrición parenteral para aplicación intravenosa

Se puede observar que algunos productos se forman tanto con administración por vía tópica como ingerida; p. ej., un extracto alimenticio, una goma de mascar, un comprimido masticable o un polvo de complemento. En este caso, la composición (p. ej., un zumo) está primero en contacto con la boca y parte de la composición se disuelve y/o se desintegra en la boca y de este modo aumenta la concentración de nitrato en la saliva de la boca debido a la presencia del nitrato en la composición como tal. A continuación, la composición (p. ej., un zumo) se deglute, se introduce en el tracto digestivo y el aumento de la concentración de nitrato en la saliva de la boca se debe a la actividad de reciclaje de nitrato de las glándulas salivales.

En una realización particular, la composición es un complemento alimenticio que comprende un extracto vegetal rico en nitrato, un antioxidante y/o un cofactor de la enzima nitrato reductasa.

20 Un extracto vegetal rico en nitrato incluye un extracto de una planta o de frutas. Ejemplos de verduras ricas en nitrato son verduras de hoja verde, tales como espinacas, acelgas, hojas de mostaza, rúcula, col rizada y lechuga. Otras verduras ricas en nitrato son remolacha, rábanos, brócoli, apio o col. Ejemplos de frutas ricas en nitrato son plátano o uvas. En una realización, la composición es un complemento alimenticio que comprende un extracto vegetal rico en nitrato.

25 En una realización particular, el extracto vegetal rico en nitrato es un extracto de remolacha. En otras realizaciones, el nitrato está en forma de una sal tal como el nitrato de sodio o el nitrato de potasio.

En una realización particular, la composición que comprende el extracto vegetal rico en nitrato comprende además un cofactor de la enzima nitrato reductasa. Ejemplos de cofactores son molibdeno o cobre.

30 Más particularmente, el extracto vegetal rico en nitrato es un extracto de remolacha, el antioxidante es vitamina C y el cofactor de la enzima nitrato reductasa es molibdeno, una sal del mismo o un extracto vegetal rico en molibdeno, p. ej., un polvo de judías. Particularmente, dicha composición se encuentra en forma líquida (p. ej., un zumo de remolacha al que se le añaden los elementos mencionados) o también en forma de, p. ej., una píldora, comprimido, goma de mascar, polvo, comprimido bucodispersable o efervescente que se disolverá con agua.

En el EJEMPLO 4.1 se describe un ejemplo de producto basado en un extracto vegetal rico en nitrato.

35 También como ejemplo de forma de administración, un sujeto puede lavarse los dientes por la mañana como de costumbre. Después, de un frasco con 92 g de complemento de extracto de remolacha/vitamina C/molibdeno (Tabla 5), se toma una dosis de 11,5 g usando una cuchara de plástico proporcionada con el frasco y llenándola

hasta la línea de 25 ml. La dosis se disolvió en 200 ml de agua, se mezcló y se ingirió. Una dosis de complemento contiene 250 mg de nitrato presente de forma natural en el extracto de remolacha y las dosis actuales recomendadas diariamente de vitamina C (80 mg) y molibdeno (50 µg) para adultos. Este producto se suministra en una dosis única por día, preferentemente por la mañana, en forma de complemento alimenticio como polvo de extracto vegetal, y proporciona un efecto inmediato (en una hora, debido a la retención del nitrato en la cavidad bucal durante la deglución) y un efecto agudo pero indirecto (entre 1 y 6 horas) debido al reciclaje del nitrato, durante el cual disminuye una caída del pH después de la comida y, por lo tanto, se proporciona protección frente a las enfermedades bucales (tales como la caries dental).

Tratamiento o prevención agudos con efectos antes de 24 horas

Como se ha mencionado, los resultados proporcionados muestran un efecto tópico directo (inmediato) del nitrato cuando se aplica (como complemento, pasta de dientes, etc.), y un efecto a corto plazo (unas horas) cuando la composición se deglute y es reciclada por el cuerpo para concentrarse en la saliva. La ventaja de tener concentraciones elevadas de nitrato durante varias horas en la saliva es que la microbiota cambia hacia una composición más asociada a la salud y una actividad en presencia del nitrato, como se observó *ex vivo* en el EJEMPLO 1 después de 5 h. En ambos casos, los efectos son agudos dentro de las 24 h posteriores al tratamiento con la composición de la invención.

Sin desear quedar limitado a teoría alguna, fue una sorpresa para los presentes inventores que hubiera una mejora (alcalinización) del pH salival tanto antes como después de un enjuague con azúcar directamente (1 h) a 4 h después de tomar una composición de nitrato. El enjuague con azúcar simula una comida, donde se sabe que el pH disminuye; por consiguiente, el EJEMPLO 2 muestra sorprendentemente que la administración de nitrato puede proporcionar una protección directa y aguda frente a una caída del pH, p. ej., después de una comida. Además, los resultados proporcionan evidencias *in vivo* de que los niveles de nitrato en la saliva permanecen en concentraciones altas (es decir, por encima de los niveles de nitrato en ayunas de un donante) durante un período de al menos 6 horas. Esto demuestra, p. ej., que un complemento alimenticio, una pasta de dientes o un comprimido que contenga nitrato tenga un efecto positivo para reducir la disbiosis bucal después de una única dosis y en 24 horas, es decir, un efecto agudo, a diferencia del estado actual de la técnica, donde los cambios en la composición de la microbiota bucal *in vivo* solo se muestran después de 1-4 semanas de tratamiento, es decir, un efecto crónico.

Los resultados proporcionados (EJEMPLO 2) muestran un efecto positivo rápido, a diferencia de todos los ensayos clínicos con un complemento de nitrato de la técnica anterior tratada, donde los participantes realizaron el tratamiento durante al menos una semana, y hasta 1,5 meses, tomando dosis diarias más altas (p. ej., 385-770 mg por día). Los inventores han visto que con una dosis única inferior a la IDA (p. ej., <222 mg para un adulto de 60 kg y <252 mg para un adulto de 70 kg), el paciente mejora su pH en pocas horas (*in vivo* y *ex vivo*). Esto permitiría tomar un tratamiento para efecto inmediato (p. ej., una "píldora anticaries"), p. ej., por la mañana y proporcionando protección frente a la caries durante todo el día.

En una realización particular, los efectos del tratamiento se ven 24 h después del consumo de la composición de la invención con un efecto agudo directo e indirecto; más particularmente, los efectos se ven dentro

de 1-12 h después del consumo de una composición; más particularmente los efectos se ven en un plazo de 1-9 h; más particularmente los efectos se ven en un plazo de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h o, 23 h.

En los experimentos *ex vivo* proporcionados en el EJEMPLO 1, se observó que una concentración de 6,5 mM de nitrato en un pequeño volumen de 250 µl, fue suficiente para cambiar drásticamente la composición de una biopelícula bucal y la actividad hacia la eubiosis asociada a la salud después de 5 h y 9 h. También se demostró que la adición de concentraciones mucho más bajas de nitrato en el intervalo micromolar evitó la caída del pH causada por el azúcar. En función de estos resultados, se puede establecer que la dosis mínima de nitrato para una composición con efecto directo (es decir, aplicación tópica en la boca) debe dar lugar a nitrato 0,1 mM en la saliva (además del nitrato que pueda estar ya presente de forma natural). Teniendo en cuenta que se tiene un mínimo de ~0,5 ml de saliva en la boca y que el peso molecular del nitrato es de 62 g/mol, la dosis para conseguir un aumento de la concentración de nitrato de 0,1 mM sería de 3,1 µg de nitrato ($3,1 \mu\text{g en } 0,5 \text{ ml } [\times 2000] = 6,2 \text{ mg en } 1 \text{ l } [\div 62] = \text{nitrato } 0,1 \text{ mM}$). Alrededor del 75 % del nitrato es eliminado del cuerpo por los riñones en la orina, mientras que el otro 25 % es reciclado por las glándulas salivales en la saliva. Por lo tanto, una dosis de nitrato para un efecto agudo indirecto (es decir, resultante de la ingestión y el reciclaje de las glándulas salivales) debería ser cuatro veces mayor para alcanzar 0,1 mM adicionales de nitrato en la saliva, lo que supone 12,4 µg de nitrato. Ambas dosis (para aplicaciones directas e indirectas) pueden ser una sal de nitrato pura o cualquier forma de nitrato vegetal en presencia o ausencia de otras moléculas.

Por consiguiente, en una realización, la concentración salival de nitrato en la boca después de la administración de la composición por encima de los niveles salivales en ayunas es: al menos 0,1 mM más 30 s después de la administración cuando la composición es una composición aplicada tópicamente y, al menos 0,1 mM más al menos 2 h después de la administración cuando la composición es una composición ingerida. Esto expresa el aumento de la concentración salival de nitrato en la boca tras la administración de la composición por encima de los niveles salivales en ayunas; es decir, como valor relativo antes y después de la administración.

De forma alternativa, la cantidad de concentración salival de nitrato en la boca tras la administración de la composición puede expresarse en valores absolutos. Por tanto, teniendo en cuenta que los niveles de nitrato salival en ayunas comienzan en 0,1 mM, en una realización, la concentración salival de nitrato en la boca tras la administración de la composición es: al menos 0,2 mM 30 s después de la administración cuando la composición es una composición aplicada tópicamente y, al menos 0,2 mM 2 h después de la administración cuando la composición es una composición ingerida. En cada uno de los casos, si el nivel de nitrato salival en ayunas es superior a 0,1 mM, el valor absoluto detectado después de la composición sería 0,1 mM por encima de los niveles detectados en ayunas (nitrato salival en ayunas expresado en mM + 0,1 mM). Si, p. ej., se detecta nitrato 0,5 mM durante el ayuno, el valor absoluto sería de 0,6 mM 30 s después de la administración cuando la composición es una composición aplicada tópicamente y, al menos 0,6 mM 2 h después de la administración cuando la composición es una composición ingerida. En una realización particular, la concentración salival de nitrato en la boca después de la administración de la composición es de al menos 3,5 mM 30 s después de la administración cuando la composición es una composición aplicada tópicamente y, al menos 3,5 mM 2 h después de la administración

cuando la composición es una composición ingerida.

Para conseguir dichas concentraciones de nitrato en la saliva, hay que administrar una determinada cantidad de nitrato, que depende del tipo de producto, de la pauta de administración y del momento del tratamiento.

En este sentido, la cantidad de nitrato por dosis de composición es de al menos 3 µg cuando la
 5 composición es una composición aplicada tópicamente, y de al menos 12 µg cuando la composición es una
 composición ingerida. Estas son las cantidades mínimas de nitrato para observar los efectos deseados. En
 realizaciones particulares, la cantidad de nitrato por dosis de la composición está entre 3 µg y 222 mg cuando la
 composición es una composición aplicada tópicamente, y entre 12 µg y 222 mg (y más particularmente 35 mg)
 cuando la composición es una composición ingerida. En realizaciones más particulares, se logran resultados
 10 óptimos cuando la cantidad de nitrato por dosis de la composición es de 190, 195, 200, 205, 210, 215 o 220 mg.

Composiciones que comprenden bacterias probióticas

En una realización, la composición que comprende nitrato del primer aspecto, se administra en
 combinación con al menos una cepa bacteriana perteneciente al género *Rothia*, donde la cepa bacteriana *Rothia*
 tiene las características antes mencionadas (a)-(e). Particularmente, la composición que comprende nitrato se
 15 administra en combinación con al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en CECT 9999,
 CECT 30000, CECT 30001, CECT 30002, CECT 30003, CECT 30004 y CECT 30005, o combinaciones de la
 misma.

Las cepas bacterianas y el nitrato de la presente invención pueden formularse para una administración
 separada, secuencial, concomitante o en mezcla. Los regímenes y formas de administración serán determinados
 20 por los expertos en la materia, p. ej., de acuerdo con el trastorno a tratar. La administración de nitrato y bacterias
 puede administrarse por separado (esperando un intervalo de tiempo entre la administración de las bacterias y el
 nitrato), de forma secuencial (una tras otra), de forma concomitante (de forma simultánea) o en mezcla (en
 conjunto). En una realización, el nitrato y las cepas de la invención se administran en un intervalo de tiempo no
 superior a 12 horas. Particularmente, el intervalo de tiempo no es superior a 6 horas. Más particularmente, el
 25 intervalo de tiempo no es superior a 1 hora. Más particularmente, el intervalo de tiempo no es superior a 5 minutos.
 En una realización más particular, el régimen terapéutico se basa en la administración simultánea de nitrato y las
 cepas. Un régimen de administración particular consiste en administrar nitrato y posteriormente administrar la/s
 cepa/s de la presente invención. En algunas realizaciones, el nitrato y la/s cepa/s se administran al mismo tiempo.
 Cuando el nitrato y la/s cepa/s se administran al paciente al mismo tiempo, pueden administrarse como formas
 30 separadas o como parte de una única composición. Cuando los productos se administran en formas farmacéuticas
 separadas, las formas farmacéuticas pueden estar en envases idénticos o diferentes.

En lo sucesivo se describen productos particulares que comprenden nitrato y/o las cepas bacterianas de
 la invención. El tipo de producto dependerá también, p. ej., de la enfermedad a tratar.

Productos para el cuidado bucal

En realizaciones particulares, las composiciones de la invención están en forma de un producto para el
 35 cuidado bucal, que comprende nitrato y/o la/s cepa/s, junto con excipientes farmacéuticamente, o excipientes
 cosméticamente aceptables, u otros ingredientes comestibles. Se entiende que las composiciones de la presente

invención estarán en una cantidad eficaz. La expresión "producto para el cuidado bucal" se refiere a los productos usados para mantener la boca y los dientes limpios con el fin de prevenir problemas dentales, más comúnmente, caries dentales, gingivitis, enfermedades periodontales (encías) y mal aliento. En este sentido, el producto de higiene bucodental no se deglute intencionadamente para la administración sistémica de agentes terapéuticos
 5 particulares, sino que se conserva en la cavidad bucal durante un tiempo suficiente para entrar en contacto con la práctica totalidad de las superficies dentales y/o los tejidos bucales con fines de actividad bucal. Ejemplos no limitantes de productos de este tipo son pastas de dientes, dentífricos, polvos de dientes, geles bucales tópicos, enjuagues bucales, productos para dentaduras postizas, pulverizadores bucales, gomas de mascar, hilo dental, cintas dentales, polvos de chorro, pastas de pulido, barnices dentales, selladores de fisuras, materiales de carga,
 10 crema o gel bucales, caramelo, pastillas para chupar, comprimido o tira bucales dispersables, o polvos que pueden espolvorearse directamente en la cavidad bucal.

En una realización particular, el producto para el cuidado bucal se selecciona del grupo que consiste en una pasta de dientes; un colutorio; un gel bucal, p. ej., para aplicar en las bolsas periodontales; una goma de mascar; y un comprimido masticable.

15 Los productos para el cuidado bucal pueden comprender adicionalmente agentes aromatizantes y enmascaradores del sabor. Ejemplos no limitantes de estos agentes para su uso en los productos para el cuidado bucal incluyen aldehído cinámico, eugenol, eucaliptol, mentol, N-etil-p-mentano-3-carboxamida, anetol, aceite de hierbabuena, aceite de menta verde y aceite de menta de maíz. Los productos para el cuidado bucal pueden incluir opcionalmente humectantes, agentes gelificantes, abrasivos, fuentes de flúor, agentes desensibilizantes,
 20 aromatizantes, coloradores, edulcorantes, conservantes, agentes estructurantes, tensioactivos, agentes antisarro y agentes antiplaca. Los productos para el cuidado bucal también pueden comprender otros agentes oralmente activos, tales como activos blanqueadores de dientes, incluyendo agentes blanqueadores u oxidantes como peróxidos, perboratos, percarbonatos, peroxiácidos, persulfatos, cloritos metálicos y combinaciones de los mismos. Las sustancias que modifican el color de los dientes también pueden considerarse entre los activos de cuidado
 25 bucal útiles en la presente invención.

La formulación de las pastas de dientes es bien conocida por los expertos en la materia. En las composiciones de pasta de dientes, es preferible usar tensioactivos no iónicos (p. ej., ésteres de ácidos grasos con azúcares) o anfóteros (p. ej., betaínas derivadas del coco), ya que los tensioactivos aniónicos tienen un efecto negativo sobre el delicado tejido epitelial de las encías. En el caso de las pastas de dientes, también resulta
 30 particularmente preferido el uso de bicarbonato sódico para neutralizar la acidez bucal. Asimismo, las pastas de dientes pueden contener agentes espesantes tales como goma xantana, cargas de sílice abrasivas y otros agentes complementarios además de los usados normalmente en la industria de las pastas de dientes. Preferentemente, las bacterias están encapsuladas o protegidas de otra forma para ser introducidas en una pasta de dientes.

Tal como saben aquellos expertos en la materia "colutorio", "enjuague bucal", "enjuague dental",
 35 "enjuague oral" o "baño bucal", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición líquida que se mantiene en la boca de forma pasiva o se hace circular alrededor de la boca mediante la contracción de los músculos periorales y/o el movimiento de la cabeza, y permite hacer gárgaras, cuando la cabeza se inclina hacia

atrás y el líquido burbujea en la parte posterior de la boca. Por lo general, los colutorios son una solución antiséptica destinada a reducir la carga microbiana de la cavidad bucal, aunque otros colutorios pueden administrarse por otras razones, como por su acción analgésica, antiinflamatoria o antifúngica. De manera adicional, algunos enjuagues actúan como sustitutos de la saliva para neutralizar el ácido y mantener la boca húmeda en caso de xerostomía (boca seca). Además del agua, pueden incluirse compuestos polihidroxilados tales como glicerina o glicoles (p. ej., propilenglicol, tensioactivos no iónicos, etc.) y otros aditivos para mejorar el aspecto, el sabor y la conservación.

Una formulación típica de goma de mascar comprende una base de chicle, edulcorantes, suavizantes/plastificantes, aromas, colorantes y, normalmente, un recubrimiento de poliol duro o en polvo. La base de chicle se considera información patentada dentro de cada empresa fabricante de chicles, pero los tres componentes principales que conforman todas las bases de chicles son resina (p. ej., terpeno, que es el componente principal), cera (que ablanda el chicle) y elastómero (que añade flexibilidad).

Los pulverizadores son composiciones iguales o similares a los colutorios, pero que se dispensan en botellas de pulverización para aplicar cómodamente la dosis necesaria para humedecer y proteger la boca sin necesidad de un enjuague posterior.

Los geles bucales incluyen polímeros que permiten una aplicación directa y estable en la cavidad bucal. En relación con estos polímeros, para los fines de esta invención, es preferible usar una combinación de polímeros conocidos genéricamente como policarbofilo y carbómero, ya que mantienen la estructura del gel estable durante tiempos muy prolongados en condiciones extremas de temperatura. Los geles también pueden incluir una cantidad de un edulcorante natural no cariogénico, tal como sorbitol.

Productos farmacéuticos y complementos alimenticios

En realizaciones particulares, las composiciones de la invención se formulan como productos farmacéuticos, particularmente, como complementos alimenticios. La expresión "producto farmacéutico" se entiende en su sentido amplio en esta descripción, incluyendo cualquier composición que comprenda un principio activo, en este caso, las cepas de la invención preferentemente en forma de composición y opcionalmente al menos un antiséptico, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. Este término no se limita a los medicamentos.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" es reconocida en la técnica e incluye compuestos, materiales, composiciones, portadores, vehículos y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (p. ej., un ser humano) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada portador, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Los portadores, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos convencionales. Algunos ejemplos no limitantes de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sucrosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de

sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógeno; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; y otras sustancias
5 compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Los excipientes se seleccionan, sin limitación, del grupo que comprende: cargas/diluyentes/agentes espesantes, aglutinantes, antiadherentes, disgregantes, recubrimientos, agentes antiaglomerantes, antioxidantes, lubricantes, edulcorantes, aromas, colorantes, surfactantes y otras clases de excipientes farmacéutica y veterinariamente aceptables.

10 Los cargas se seleccionan, sin limitación, del grupo que comprende: inulina, oligofructosa, pectina, pectinas modificadas, celulosa microcristalina, lactosa, almidón, maltodextrina, sacarosa, glucosa, fructosa, manitol, xilitol, sorbitol no cristalizante, carbonato de calcio, fosfato dicálcico, otras cargas inorgánicas y orgánicas inertes farmacológicamente aceptables, y mezclas de estas sustancias. En la forma farmacéutica de la suspensión bucal, las cargas o diluyentes se seleccionan del grupo que comprende: aceite vegetal, ácido oleico, alcohol
15 oleílico, polietilenglicol líquido, otros líquidos inertes farmacológicamente aceptables, o mezclas de estas sustancias.

Los aglutinantes se usan en las formas farmacológicas sólidas, p. ej., para mantener unidos los ingredientes de un comprimido, para garantizar que los comprimidos y los gránulos puedan formarse con resistencia mecánica requerida, y para dar volumen a los comprimidos de baja dosis activa. Los aglutinantes en
20 las formas farmacéuticas sólidas como comprimidos son: lactosa, sucrosa, almidón de maíz (millo), almidones modificados, celulosa microcristalina, celulosa modificada (p. ej., hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) e hidroxietilcelulosa), otros éteres de celulosa solubles en agua, polivinilpirrolidona (PVP) también conocida como povidona, polietilenglicol, sorbitol, maltitol, xilitol y fosfato de calcio dibásico; otros aglutinantes adecuados farmacológicamente aceptables, o mezclas de estas sustancias.

25 Los antiadherentes se usan para reducir la adherencia entre el polvo (gránulos) y las caras del punzón y evitan de este modo que se adhieran a los punzones de los comprimidos. También se usan para ayudar a proteger a los comprimidos de la adherencia. El más habitualmente usado es el estearato de magnesio.

Como desintegrantes y superdesintegrantes en formas farmacéuticas sólidas como comprimidos y cápsulas, se usan las siguientes sustancias, sin limitación: polivinilpirrolidona reticulada, almidón glicolato de sodio,
30 carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa de calcio y formaldehído-caseína, otros desintegrantes y superdesintegrantes adecuados farmacológicamente aceptables, o sus mezclas.

Los recubrimientos en el caso de las formas farmacéuticas sólidas, tales como los comprimidos y los gránulos para el llenado de cápsulas, protegen a los ingredientes del deterioro por humedad del aire, facilitan la deglución de los comprimidos grandes y de sabor desagradable y/o, en el caso de los recubrimientos entéricos,
35 garantizan el paso intacto a través de un medio fuertemente ácido como es el jugo gástrico (pH alrededor de 1), y que permiten la liberación en el duodeno o el íleon (intestino delgado). En la mayoría de los comprimidos con recubrimiento, se usa un recubrimiento de película de éter de celulosa e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Ocasionalmente, se usan otros materiales de recubrimiento, p. ej., polímeros y copolímeros sintéticos como ftalato de polivinilacetato (PVAP); copolímeros de acrilato de metilo-ácido metacrílico; copolímeros de metacrilato de metilo-ácido metacrílico; goma laca, zeína de proteína de maíz u otros polisacáridos; ceras o sustancias similares a la cera tales como cera de abejas, ácido esteárico; alcoholes grasos superiores como alcohol cetílico o estearílico; 5 parafina sólida; monoestearato de glicerol; diestearato de glicerol, o sus combinaciones. Las cápsulas están recubiertas con gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa.

Los recubrimientos entéricos controlan la velocidad de liberación del fármaco y determinan el lugar donde se liberará el fármaco en el tracto digestivo. Los materiales usados para los recubrimientos entéricos incluyen ácidos grasos, ceras, goma laca, plásticos y fibras vegetales y sus mezclas, también en combinación con otros 10 recubrimientos mencionados anteriormente.

Un agente antiapelmazante es un aditivo que se coloca en materiales en polvo o granulados para evitar la formación de grumos (apelmazamiento) y para facilitar el envasado, el transporte y el consumo. Como agentes antiapelmazantes en formas farmacéuticamente sólidas como comprimidos, cápsulas o polvos, se usan los siguientes: estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal, talco, otros agentes antiapelmazantes 15 farmacológicamente aceptables o sus mezclas.

Los lubricantes se usan en formas farmacológicas sólidas, en particular en comprimidos y cápsulas, para evitar que los ingredientes se aglutinen y se adhieran a los punzones de los comprimidos o a la máquina de llenado de cápsulas, y también en las cápsulas duras. Como lubricantes, el talco o la sílice, y las grasas, p. ej., estearina vegetal, estearato de magnesio o ácido esteárico, y mezclas de los mismos, son los lubricantes de uso más 20 frecuente en los comprimidos o las cápsulas de gelatina dura.

Los edulcorantes se añaden para hacer que los ingredientes sean más apetecibles, especialmente en las formas farmacéuticas sólidas, p. ej., comprimidos masticables, así como en las formas farmacéuticas líquidas, como jarabe para la tos. Los edulcorantes pueden seleccionarse de edulcorantes artificiales, naturales o sintéticos o semisintéticos; ejemplos no limitantes de edulcorantes son aspartamo, acesulfamo de potasio, ciclamato, 25 sucralosa, sacarina, azúcares o cualquier mezcla de los mismos.

Los aromatizantes pueden usarse para enmascarar principios activos de sabor desagradable en cualquier forma farmacéutica. Los aromatizantes pueden ser naturales (p. ej., extracto de frutas) o artificiales. Por ejemplo, para mejorar: (1) un producto amargo, se puede usar menta, cereza o anís; 2) un producto salado, se puede usar melocotón o albaricoque o regaliz; (3) un producto ácido, frambuesa; y (4) un producto excesivamente dulce, 30 vainilla.

Excepto las sustancias auxiliares de la clase de los excipientes, la formulación de la presente invención puede contener otras sustancias farmacológicamente activas o nutritivas que incluyen, aunque de forma no limitativa, vitaminas, tales como vitamina D (calciferol) en forma química farmacéuticamente aceptable, sal o derivados; minerales en forma de forma química farmacéutica y nutricionalmente aceptable; y L-aminoácidos. En 35 cuanto a la preparación de las formulaciones de la presente invención está dentro del alcance del experto ordinario en la materia y dependerá de la formulación farmacéutica final. Por ejemplo, y sin limitación, cuando la forma farmacéutica final es una sólida oral, tal como comprimidos, cápsulas, polvo, gránulos, suspensión bucal, etc., el

proceso de preparación de las formas farmacéuticas sólidas de la formulación incluye la homogeneización de: (1) el(los) principio(s) activo(s), que comprende(n) al menos una o más bacterias probióticas tratadas posteriormente de la invención en una cantidad eficaz; (2) con uno o más excipientes para formar una mezcla homogénea que es, p. ej., de acuerdo con los requisitos, sometida a lubricación con estearato de magnesio u otros lubricantes dando la forma farmacéutica final de polvo. Un polvo homogéneo de este tipo se introduce en cápsulas de gelatina ordinarias o, de forma alternativa, en cápsulas gastrorresistentes. En el caso de los comprimidos, se fabrican por compresión directa o por granulación. En el primer caso, se prepara una mezcla homogénea de principios activos y excipientes adecuados, tales como lactosa anhidra, sorbitol no cristalizante y otros. En el segundo caso, los comprimidos se procesan sobre la mezcla en forma granulada. Los gránulos se preparan mediante un proceso de granulación de los principios activos de la formulación con cargas, aglutinantes, desintegrantes adecuados y una pequeña cantidad de agua purificada. Los gránulos de este tipo preparados se tamizan y se secan hasta que el contenido de agua sea <1 % en p/p.

En cuanto al proceso de preparación de formas farmacéuticas líquidas (p. ej., suspensión bucal), implica la homogeneización del(de los) ingrediente(s) activo(s) de la formulación comprendiendo al menos una o más bacterias probióticas tratadas posteriormente de la invención en una cantidad eficaz en un diluyente líquido inerte (carga), tal como diversos aceites vegetales como aceite de girasol, soja u oliva; ácido oleico; alcohol oleílico; polietilenglicoles líquidos como PEG 200, PEG 400 o PEG 600; u otros líquidos inertes farmacológicamente aceptables. El proceso implica además el tratamiento de la mezcla homogénea con uno o más procesos seleccionados del grupo que comprende: (1) estabilización de la formulación, por adición y homogeneización de estabilizadores de suspensión como cera de abejas, dióxido de silicio coloidal, etc.; (2) endulzamiento de la formulación; por adición y homogeneización de edulcorante; (3) aromatización de la formulación, por adición y homogeneización de aromatizante. Las formas de este tipo de la formulación pueden contener también otros excipientes o ingredientes, usualmente empleados en la técnica.

El producto farmacéutico puede adoptar diferentes formas o nombres dependiendo de la ruta de aprobación del producto y también dependiendo del país. A modo de ejemplo, un medicamento es un producto farmacéutico particular. Un alimento médico es otro producto farmacéutico particular. Las expresiones "alimento médico" o "alimento para fines médicos especiales" se usan en algunos países para referirse a un alimento especialmente formulado y destinado al tratamiento dietético de una enfermedad que tiene necesidades nutricionales distintivas que no pueden satisfacerse solo con la dieta normal. Se definen en normativas tales como las Enmiendas a la Ley de Fármacos Huérfanos de 1988 de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, y la Directiva 1999/21/CE de la Comisión en Europa. Los alimentos médicos se distinguen de la categoría más amplia de los complementos alimenticios y de los alimentos tradicionales que llevan una declaración de salud. Por tanto, en una realización particular, las cepas de la invención se formulan como un alimento médico.

Un complemento alimenticio, también conocido como complemento dietético o complemento nutricional, se considera otro producto farmacéutico particular. Se trata de una preparación o producto destinado a complementar la dieta, elaborado a partir de compuestos habitualmente usados en productos alimentarios, que aportan nutrientes o ingredientes beneficiosos que no se suelen ingerir en la dieta normal o que pueden no

consumirse en cantidades suficientes. En su mayoría, los complementos alimenticios se consideran productos alimenticios, pero a veces se definen como fármacos, productos naturales para la salud o productos nutracéuticos. En el sentido de la presente invención, los complementos alimenticios también incluyen nutracéuticos. Los complementos alimenticios suelen venderse "sin receta", es decir, sin prescripción. Si el complemento alimenticio
 5 adopta la forma de una píldora, una cápsula, un comprimido o un polvo, comprende excipientes que son idénticos a los que se usan en los medicamentos. Sin embargo, un complemento alimenticio también puede adoptar la forma de un producto alimenticio fortificado con algunos nutrientes (p. ej., una barrita o un yogur).

Por tanto, en una realización particular, las composiciones de la invención se formulan como un complemento alimenticio. El complemento alimenticio puede administrarse como tal, puede mezclarse con un
 10 líquido bebible adecuado, tal como agua, yogur, leche o zumo de frutas, o puede mezclarse con alimentos sólidos o líquidos. En este contexto, el complemento alimenticio puede encontrarse en forma de comprimidos o pastillas para chupar, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, sobres, dulces, barritas, jarabes y formas de administración correspondientes, generalmente en forma de dosis unitaria. Más particularmente, las composiciones de la invención se formulan como comprimidos, píldoras, cápsulas, un extracto alimenticio
 15 (particularmente a base de extracto de remolacha como se ha explicado anteriormente), y un polvo de complemento.

Las composiciones de la invención también pueden incluirse en una variedad de productos alimenticios, tales como productos lácteos (un yogur, un queso, una leche fermentada, un polvo de leche, un producto fermentado a base de leche, un helado, un producto fermentado a base de cereales, polvo a base de leche), pan,
 20 barritas, productos untables, galletas y cereales, una bebida, diferentes tipos de aceite o un aderezo. La expresión "producto alimenticio" se usa en el presente documento en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto, en cualquier forma de presentación, que pueda ser ingerido por un animal, pero excluyendo los productos farmacéuticos y veterinarios. Ejemplos de otros productos alimenticios son productos cárnicos, productos untables de chocolate, rellenos y glaseados, chocolate, productos de confitería, productos de pastelería, salsas y sopas,
 25 zumos de frutas y blanqueadores de café. Productos alimenticios particularmente interesantes son complementos alimenticios y fórmulas infantiles. El producto alimenticio comprende preferentemente un material portador tal como avenate, alimentos fermentados con ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, carbohidratos, proteínas y proteínas glicosiladas. En una realización particular, las cepas de la invención están encapsuladas o recubiertas.

Ejemplos de productos particulares

30 En realizaciones particulares, la composición comprende también molibdeno y/o vitamina C y/o (otros) antioxidantes y/o cualquier fuente de carbono para las bacterias de reducción de nitrato.

En el EJEMPLO 4 se describen ejemplos de productos de este tipo, ingredientes contenidos y forma de administración:

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de un comprimido
 35 masticable, que proporciona un efecto directo e indirecto. En particular, el comprimido masticable es, p. ej., el descrito en el EJEMPLO 4.2. Los comprimidos masticables (p. ej., 0,5-3 g) que contienen nitrato (p. ej., 222 mg si se trata de 1 dosis, 111 mg si se trataba de 2 dosis, 74 mg si se trataba de 3 dosis) pueden consumirse diariamente

por masticado y deglución después del desayuno e higiene bucal por la mañana y, si se dividieron en dos dosis, también después del almuerzo y, si se dividieron en tres dosis, también después de la cena e higiene bucal al final del día. Algunas variantes de los comprimidos de 1, 2 o 3 dosis contienen también, p. ej., 80 mg, 40 mg o 26,67 mg de vitamina C, respectivamente, y/o, p. ej., 50 µg, 25 µg o 16,67 µg de molibdeno. Por último, algunas variantes de los comprimidos contienen cantidades diarias aceptables de antioxidantes disponibles en el mercado, que se dividieron en 1, 2 o 3 dosis. Este producto es ideal para un efecto agudo directo e indirecto sobre las enfermedades bucales, p. ej., durante un período de 0-6 h después del consumo.

En particular, el comprimido masticable es un comprimido masticable anticaries como, p. ej., el descrito en el EJEMPLO 4.3. Los comprimidos (p. ej., 0,5-3 g) que contienen, p. ej., una cantidad entre 3,1 µg-74 mg de nitrato, se consumen tragándolos antes de una comida. Se pueden consumir un máximo de tres comprimidos por día y se recomienda consumirlos 1 h antes de las tres comidas o tentempiés con más azúcar, preferentemente cada uno en una parte diferente del día (mañana, tarde y noche). Este producto es útil para un efecto indirecto agudo sobre las enfermedades bucales, p. ej., durante un período de 0-6 h después del consumo, así como para mejorar todos los estados de salud que están influenciados por un déficit de óxido nítrico.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de una goma de mascar que proporciona un efecto directo e indirecto. En particular, la goma de mascar es, p. ej., la descrita en el EJEMPLO 4.3. Las gomas de mascar (p. ej., 1-2 g) que contienen, p. ej., una cantidad entre 3,1 µg-37 mg de nitrato, se consumieron deglutiéndolas antes de una comida. Se podía consumir un máximo de seis gomas de mascar por día y se recomendaba consumirlas justo después de las comidas o los tentempiés, preferentemente al menos una en una parte diferente del día (mañana, tarde y noche). Se añadieron otras moléculas basándose en el EJEMPLO 4.2. Esto es ideal para un efecto indirecto agudo sobre las enfermedades bucales, p. ej., durante un período de 1-6 h después de la ingestión, así como para mejorar todos los estados de salud que están influenciados por un déficit de óxido nítrico.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de pasta de dientes, que proporciona un efecto directo. En particular, la pasta de dientes es, p. ej., la descrita en el EJEMPLO 4.5. Una dosis de pasta de dientes de, p. ej., 0,2-1 g que contiene, p. ej., una cantidad entre 3,1 µg-74 mg de nitrato, p. ej., 26,67 mg de vitamina C y, p. ej., 16,67 µg de molibdeno y otras moléculas basándose en el EJEMPLO 4.2, se usa por individuos como normalmente sin exceder las tres veces de cepillado de dientes por día. Se administra en el momento del cepillado, al igual que con una pasta de dientes convencional, por contacto con los dientes y la encía, lo que proporciona una aplicación tópica del nitrato directamente a las biopelículas bucales, quedando parte del nitrato también retenido en la cavidad bucal hasta que el aclaramiento de la saliva lo elimina. Se recomienda no lavarse la boca o solo enjuagarla brevemente una vez con agua después de la aplicación.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de un colutorio, que proporciona un efecto directo. En particular, el colutorio es, p. ej., el descrito en el EJEMPLO 4.6. El volumen del colutorio a tomar es, p. ej., de 5-30 ml, particularmente 15 ml. Se realiza un enjuague oral durante, p. ej., 1-60 s, mediante el cual se administra una aplicación tópica del producto de nitrato a la lengua, dientes, mucosa bucal y encías, y el nitrato se proporciona por lo tanto directamente a las biopelículas bucales, quedando parte del nitrato

también retenido en la cavidad bucal hasta que el aclaramiento de la saliva lo elimina. Se recomienda no lavarse la boca después de la aplicación.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de gel bucal para las bolsas periodontales, que proporciona un efecto directo. En particular, el gel bucal es, p. ej., el descrito en el EJEMPLO 4.7. Un gel bucoadhesivo es aplicado con una jeringa por un profesional dentro de las bolsas periodontales de los pacientes con una enfermedad periodontal, conteniendo una concentración de, p. ej., una cantidad entre 3,1 µg-222 mg de nitrato en todo el volumen aplicado sobre una o varias bolsas, con o sin un probiótico de reducción de nitrato. Se aplica dentro de las bolsas en las visitas basales, de tratamiento y de seguimiento del paciente como tratamiento inicial. Se recomienda no comer ni beber durante una hora después de la aplicación. Puede combinarse un tratamiento de mantenimiento, en el que se proporciona un complemento o comprimido diarios de nitrato durante, p. ej., de 1 a 4 semanas por la mañana. Cuando la composición comprende bacterias probióticas, el producto no se recomienda a pacientes inmunodeprimidos.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de cápsula o píldora de dosis diaria, que proporciona un efecto indirecto. En particular, la cápsula o píldora es, p. ej., la descrita en el EJEMPLO 4.8. Las cápsulas (p. ej., 0,1-3 g) que contenían nitrato (p. ej., 222 mg si se trataba de 1 dosis, 111 mg si se trataba de 2 dosis, 74 mg si se trataba de 3 dosis) se consumieron diariamente por ingestión antes del desayuno e higiene bucal por la mañana y, si se dividieron en dos dosis, también antes del almuerzo y, si se dividieron en tres dosis, también antes de la cena e higiene bucal al final del día. Algunas variantes de las cápsulas de 1, 2 o 3 dosis contenían también, p. ej., 80 mg, 40 mg o 26,67 mg de vitamina C, respectivamente, y/o 50 µg, 25 µg o 16,67 µg de molibdeno. Por último, algunas variantes de las cápsulas contenían cantidades diarias aceptables de antioxidantes disponibles en el mercado, que se dividieron en 1, 2 o 3 dosis. Para elegir las combinaciones y cantidades óptimas de moléculas, se analizaron las diferentes cápsulas. Esto es ideal para un efecto agudo directo e indirecto sobre las enfermedades bucales, p. ej., durante un período de 0-6 h después de la ingestión.

En particular, la píldora, cápsula o comprimido masticable es una píldora antihalitosis para tomar antes de una reunión. Una píldora como la descrita anteriormente podría tomarse, p. ej., por la mañana antes de una reunión que tendrá lugar 2-4 horas más tarde. Para un efecto rápido antes de una reunión, el nitrato puede encontrarse en forma de un comprimido masticable con una dosis alta (p. ej., 222 mg) y tomado justo antes de la reunión.

En una realización particular, la composición de la invención comprende bacterias probióticas y se aplica con una férula. En particular, la composición es, p. ej., la descrita en el EJEMPLO 4.9. Se proporciona un probiótico de reducción de nitrato en forma liofilizada con vitamina C y molibdeno, así como un agente espesante. Se mezcla con agua y se aplica en los dientes con una férula durante 5-30 minutos, para permitir la colonización bacteriana de la biopelícula dental. Se aplica por la noche al menos 30 minutos después de la higiene bucodental convencional, evitando comer o beber durante al menos una hora después de la aplicación. Esto es especialmente adecuado para tratar y prevenir enfermedades dentales (caries o enfermedades de las encías). En otro modo de aplicación particular, la preparación probiótica se aplica en la lengua durante, p. ej., 1-5 minutos, lo que es

especialmente adecuado para tratar la halitosis. Este producto no está recomendado a pacientes inmunodeprimidos.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de nutrición parenteral para aplicación intravenosa en las unidades de cuidados intensivos (UCIs), que proporciona un efecto indirecto.

5 En particular, la nutrición parenteral es, p. ej., la descrita en el EJEMPLO 4.10. La nutrición parenteral (un paciente dependiente, p. ej., 10-1600 ml) que contiene nitrato (p. ej., una cantidad entre 12,4 µg-222 mg) en forma de sal o extracto vegetal puede usarse para prevenir el desarrollo de enfermedades bucales en pacientes que se encuentran en la UCI. Algunas variantes de la nutrición parenteral también contienen vitamina C, antioxidantes y molibdeno adicionales. Algunas variantes son más adecuadas para bebés, algunas para niños pequeños, algunas
10 para infantes, algunas para adolescentes y algunas para adultos.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de caramelos para niños y adultos, tales como los descritos en el EJEMPLO 4.11.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de producto que contiene almidón y azúcar, tal como el descrito en el EJEMPLO 4.12.

15 En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de alimentos y tentempiés para mascotas y ganado, tales como los descritos en el EJEMPLO 4.13.

En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de pasta lingual, tal como la descrita en el EJEMPLO 4.15.

20 En una realización particular, la composición de la invención se encuentra en forma de hilo dental, tal como el descrito en el EJEMPLO 4.16.

Método de selección de un tratamiento terapéutico o una estrategia preventiva

La presente invención también contempla la selección de terapias personalizadas o estrategias preventivas de acuerdo con la capacidad de reducción de nitrato (CRN) de un sujeto a tratar. El EJEMPLO 5 en el presente documento proporcionado muestra que los sujetos pueden ser estratificados o segmentados según su
25 CRN. Después, se puede establecer una terapia personalizada o una estrategia preventiva en función de su CRN.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para seleccionar un tratamiento terapéutico o una estrategia preventiva para una enfermedad bucal mediada por biopelículas o una enfermedad o estado que se beneficia del suministro de óxido nítrico. El método comprende una primera etapa (i) donde se mide la capacidad de reducción de nitrato de un sujeto en una muestra bucal (preferentemente de saliva). En una segunda etapa (ii),
30 el sujeto se clasifica de acuerdo con el grado de capacidad de reducción de nitrato del sujeto.

La capacidad de reducción de nitrato de un sujeto puede medirse, p. ej., mediante el método descrito en el EJEMPLO 5. Por ejemplo, se prepara una dilución 1:10 de nitrato estéril 80 mM (4960 mg/l) en solución de agua en una muestra de saliva en ayunas, lo que conduce a una concentración añadida de 8 mM (496 mg/l). Por ejemplo, se añaden 0,05 ml de nitrato 80 mM a una muestra de saliva en ayunas de 0,45 ml para alcanzar un volumen final
35 de 0,5 ml, lo que da lugar a una concentración final de nitrato de 8 mM. Una muestra se congela directamente a -20 °C y otra se incuba a 37 °C durante 2 horas. El nitrato se mide en ambas muestras como se describe en el EJEMPLO 5 y la diferencia de mg/l entre las dos muestras, corresponde al nitrato reducido.

Con los valores de nitrato, el sujeto se clasifica de acuerdo con su grado de capacidad de reducción de nitrato, donde:

ii.1) una disminución de la cantidad de nitrato en relación con una muestra bucal no incubada por debajo de 57 mg/l (o inferior al 15 % expresado como porcentaje de reducción) es indicativa de una capacidad deficiente de reducción de nitrato,

ii.2) una disminución de la cantidad de nitrato en relación con una muestra bucal no incubada entre 57 mg/l y 175 mg/l, inclusive, (entre 15 % y 35 %, inclusive) es indicativa de una capacidad intermedia de reducción de nitrato, y

ii.3) una disminución de la cantidad de nitrato en relación con una muestra bucal no incubada por encima de 175 mg/l (o por encima del 35 %) es indicativa de una buena capacidad de reducción de nitrato.

El método comprende además (iii) seleccionar un tratamiento terapéutico o una estrategia preventiva de acuerdo con la capacidad de reducción de nitrato, donde:

iii.1) a un sujeto con una capacidad deficiente de reducción de nitrato se le administra una composición que comprende nitrato y una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia* o *Neisseria*,

iii.2) a un sujeto con una capacidad intermedia de reducción de nitrato se le administra una composición que comprende nitrato y/o una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia* o *Neisseria*, y

iii.3) a un sujeto con una buena capacidad de reducción de nitrato se le administra una composición que comprende nitrato.

Se ha definido anteriormente una enfermedad bucal mediada por biopelículas o una enfermedad o estado que se beneficia del suministro de óxido nítrico. El sujeto es particularmente un mamífero, y más particularmente un ser humano. En particular, un sujeto con una buena capacidad de reducción de nitrato se beneficiará muy probablemente de la administración de una composición que comprenda nitrato, dado que el sujeto ya tiene bacterias para realizar esa función y, por lo tanto, solo necesita el sustrato de la reacción. Por el contrario, un sujeto con una capacidad normal de reducción de nitrato muy probablemente se beneficiará de la administración de una composición que comprenda nitrato y/o una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia* o *Neisseria*, dado que tanto los niveles del sustrato como los niveles de las bacterias pueden mejorar la CRN. Y un sujeto con una capacidad deficiente de reducción de nitrato muy probablemente se beneficiará de la administración de una composición que comprenda nitrato y una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia* o *Neisseria*, dado que este sujeto necesita ambas para poder reducir el nitrato.

En una realización particular, la etapa (i) del método, es decir, la medición de la capacidad de reducción de nitrato de un mamífero en una muestra bucal, comprende las etapas de:

1) recoger una muestra de saliva;

2) añadir una cantidad conocida de nitrato;

3) incubar a 37 °C durante al menos una hora; y

4) medir la cantidad de nitrato que queda en la muestra de saliva;

donde una mayor cantidad de nitrato que queda es indicativa de una capacidad deficiente de reducción de nitrato.

En el EJEMPLO 5 se describe un ejemplo de método para medir la capacidad de reducción de nitrato de un mamífero en una muestra bucal.

Particularmente, las composiciones que comprenden nitrato y/o una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia* o *Neisseria* son las descritas en las secciones anteriores.

El método de selección de un tratamiento terapéutico adecuado o de una estrategia preventiva puede formularse alternativamente como un método de selección de un sujeto que padece una enfermedad bucal mediada por biopelículas o una enfermedad o estado que se beneficia del suministro de óxido nítrico para recibir un tratamiento terapéutico o una estrategia preventiva seleccionado de las diferentes combinaciones de una composición que comprende nitrato y/o una cepa bacteriana perteneciente a los géneros *Rothia* o *Neisseria*, comprendiendo el método (i) medir la capacidad de reducción de nitrato de un mamífero en una muestra bucal, y (ii) seleccionar a dicho sujeto para que reciba dicho tratamiento terapéutico o estrategia preventiva en función de la capacidad de reducción de nitrato explicada anteriormente (i. es decir, capacidad de reducción de nitrato deficiente, normal y buena). Esto también puede referirse a un método de estratificación o segmentación de los sujetos según su CRN.

Por tanto, en el presente documento se proporciona un método para restablecer la CRN de un sujeto en la cavidad bucal.

Para evitar cualquier tipo de dudas, los métodos de la invención no implican un diagnóstico practicado sobre el cuerpo humano o animal; los métodos se llevan a cabo particularmente sobre una muestra que se ha tomado previamente del sujeto.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Estudio *ex vivo* - efectos del nitrato en el crecimiento de una biopelícula bucal de individuos humanos sanos

Materiales y métodos

1. Muestreo de saliva no estimulada

Para este estudio, se reclutaron adultos que declararon estar sistémicamente sanos en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP-FISABIO, Valencia, España). Se excluyeron los individuos que declararon tener caries o cualquier antecedente de periodontitis.

La saliva no estimulada se recogió de tres grupos de donantes por la mañana mediante hipersalivación (Navazesh y Christensen, 1982) en un tubo estéril en una sala de reposo hasta alcanzar un volumen de 5 ml. El grupo primero y segundo consistía en 12 donantes (D1-D12 y D13-D24, respectivamente). Estos donantes fueron instruidos para tomar un desayuno normal y abstenerse de la higiene bucal por la mañana antes de la recogida de saliva. En primer lugar, se recogió la saliva de D1-D12 al menos una hora después del desayuno y se usó como inóculo para el crecimiento de una biopelícula *in vitro*. Después, se repitió este experimento con la saliva de D13-D24 para realizar mediciones adicionales. El tercer grupo consistía en 9 donantes (D25-D33) a los que se les pidió que donaran saliva en ayunas (es decir, absteniéndose de desayunar y de higiene bucal). La saliva de este grupo se usó para determinar el efecto del nitrato en la acidificación debido a la fermentación de la glucosa.

La saliva reciente no estimulada se usó siempre directamente en los experimentos o se mantuvo a 4 °C

durante un máximo de 1 h antes de su uso. Todos los donantes dieron su consentimiento informado antes de la recogida del material clínico y el protocolo fue aprobado por el Comité Ético de la DGSV-CSISP (Autoridad Sanitaria Valenciana).

2. Crecimiento de biopelículas bucales *in vitro* y cuantificación basada en la impedancia

Las biopelículas de D1-D12 crecieron a partir de saliva no estimulada en placas de 96 pocillos "Placa E 96" (ACEA Biosciences) en el sistema xCELLigence (ACEA Biosciences). Cada Placa E 96 está recubierta con una capa dorada en el fondo de los pocillos que está conectada a microelectrodos, lo que permite medir el crecimiento de una biopelícula en tiempo real (Mira *et al.*, 2019). Se ha demostrado que la impedancia formada por la adherencia de la biopelícula es proporcional a la cantidad de biopelículas monoespecie, y una medida de la masa de la biopelícula es proporcionada por el correspondiente índice celular, expresado en unidades arbitrarias (Ferrer *et al.*, 2017).

Se preparó un medio ICC (Biolife) con 0,05 mg/l de hemina adicionales, 0,005 mg/l de menadiona y 0,2 mM de vitamina K (todos ellos de Sigma-Aldrich), de los que se añadieron 100 µl a cada pocillo para las mediciones de impedancia de fondo. Se añadieron 25 µl adicionales de un nitrato 65 mM en agua o solo agua a cada pocillo de la condición de nitrato o de control, respectivamente. Después, se añadieron 125 µl de saliva recién recogida, lo que llevó a una concentración final de nitrato 6,5 mM en la condición de nitrato. La Placa E 96 se colocó en el sistema xCELLigence dentro de una incubadora a 37 °C. Cada 10 minutos se realizó una medición del índice celular. Todos los experimentos se realizaron sin agitación y se favorecieron las condiciones anaeróbicas sellando los pocillos con papel de aluminio adhesivo (VWR), lo que permitió previamente el crecimiento de bacterias estrictamente anaeróbicas (datos no mostrados). Para las mediciones de 0 h, se usaron mezclas 1:1 de medio y saliva. Después, se tomaron duplicados del sobrenadante y de la biopelícula tras 5 h y 9 h de crecimiento. Se tomaron muestras del sobrenadante y se almacenaron a -20 °C hasta las mediciones de pH, nitrato, nitrito, amonio y lactato. Tras esto, se realizó una etapa de lavado con PBS y se resuspendieron los duplicados de las biopelículas en conjunto en 200 µl de PBS para almacenarlos a -20 °C hasta el aislamiento del ADN para su secuenciación.

Las biopelículas del segundo grupo de 12 donantes (D13-D24) crecieron de forma idéntica al primer grupo, se tomaron muestras sin una etapa de lavado con PBS y se almacenaron individualmente en 75 µl de PBS para cuantificar las proteínas y el ADN a las 5 h y a las 9 h. Se observó que el nitrato afecta a la impedancia del sistema xCELLigence y este efecto dependía de la saliva del donante. Por lo tanto, para D13-D24, se usaron controles con saliva filtrada libre de microorganismos para normalizar las mediciones del índice celular. Para ello, la saliva se filtró primero con un filtro de 5 µm y luego con un filtro de 0,1 µm. Todas las muestras se almacenaron inmediatamente a -20 °C en tubos Eppendorf hasta los análisis posteriores.

3. Incubación de la saliva con nitrato y glucosa

Se usó la saliva no estimulada de D25-D33 para analizar el efecto de diferentes concentraciones de nitrato sobre la caída del pH provocada por el 0,2 % de glucosa tras 5 h de incubación. Para cada donante, se añadieron 187 µl de saliva y 22 µl de glucosa (2 % diluida en agua) por pocillo de una placa convencional de 96 pocillos. Después, se añadieron 11 µl de agua sin o con diferentes concentraciones de nitrato, dando lugar a concentraciones finales de 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2,5 mM, 3,5 mM, 4,5 mM, 5,5 mM, 6,5 mM, 7,5 mM y

8,5 mM de nitrato. La placa se selló con papel de aluminio adhesivo (VWR) y se incubó durante 5 h a 37 °C. Tras la incubación, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta las mediciones de pH.

4. Mediciones de nitrato, nitrito, amonio, lactato y pH

Para las mediciones de nitrato, nitrito, amonio, lactato y pH, se usó el RQflex® 10 Reflectoquant® (Merck Millipores), un reflectómetro que mide la reflexión de las tiras reactivas que cambian de color. Las tiras de pH (Merck Millipores ref. 1.16996.0001) tenían un intervalo de pH 4 a 9 y un tiempo de incubación de 10 segundos en la tira, las tiras de nitrato (ref. 1.16995.0001) tenían un intervalo de 3-90 mg/l y un tiempo de incubación de 1 min, las tiras de nitrito (ref. 1.16973.0001) un intervalo de 0,5-25 mg/l y un tiempo de incubación de 15 segundos, las tiras de amonio (ref. 1.16899.0001) un intervalo de 5-20 mg/l y un tiempo de incubación de 4 min, y las tiras de lactato (ref. 1.16127.0001) un intervalo de 3-60 mg/l y un tiempo de incubación de 6 min. La precisión de todos los métodos de reflectometría se confirmó mediante el uso de controles con concentraciones conocidas de los diferentes compuestos medidos.

En el caso de las mediciones de nitrato, nitrito, amonio y lactato, el sobrenadante de los cultivos se diluyó 1:10 con agua para minimizar la interferencia de los compuestos del medio. En algunos casos, el sobrenadante tuvo que diluirse más para que los compuestos estuvieran en el intervalo de detección de las tiras. Para las mediciones de pH, se usó el sobrenadante sin diluir. Para todas las mediciones, excepto la del amonio, se añadieron 15 µl de sobrenadante (diluido) a dos parches reactivos en una tira, se eliminó el exceso de líquido inclinando el lado de la tira sobre un tejido, se aplicó el tiempo de incubación correspondiente para cada medición y se puso la tira dentro del reflectómetro.

Primero se midió el nitrito. Los sobrenadantes diluidos en los que se detectó 0,5 mg/l o más de nitrito se trataron con ácido amidosulfúrico para eliminar el nitrito antes de las mediciones de nitrato. Para ello, se mezclaron 35 µl de sobrenadante diluido con 1,5 µl de solución de ácido amidosulfúrico (10 %), y se añadieron directamente a las tiras.

Para las mediciones de amonio, se hicieron alícuotas de 50 µl de sobrenadante diluido a las que se añadieron primero 10 µl del reactivo 1 del kit y se resuspendieron bien. Después, se añadieron directamente 15 µl de una mezcla recién hecha de una cucharada del reactivo 2 (ambos proporcionados con el kit) disuelto en 1,25 ml de agua y se resuspendió bien. Esta solución se añadió directamente a las tiras y se incubó. Cinco segundos antes de las mediciones, se eliminó el exceso de líquido. Todas las concentraciones medidas se ajustaron mediante factores de dilución.

5. Cuantificación de las proteínas de las biopelículas

Las biopelículas crecidas durante 5 h y 9 h se resuspendieron en 75 µl de PBS. Para la cuantificación de proteínas, se aplicó el ensayo de proteínas de Bradford, que se basa en el cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie (G-250) cuando se une a las proteínas. Se añadieron duplicados de 15 µl de sedimento resuspendido en diferentes pocillos de una placa convencional de 96 pocillos. Después, se añadieron 240 µl de reactivo Bradford (Sigma-Aldrich), que contenía G-250, y, tras 5 minutos de incubación en la oscuridad, se midió la absorbancia con un lector de placas Infinite F200 (TECAN) a 600 nm. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando una curva de calibración con concentraciones conocidas de ASB (intervalo: 0 a 1,5 mg/ml,

Sigma-Aldrich) en cada placa.

6. Composición de la biopelícula determinada por secuenciación de ADNr 16

6.1. Extracción de ADN para secuenciación

Para la extracción de ADN, las biopelículas se resuspendieron en 100 µl de PBS y se desagregaron 30 s en un baño de ultrasonidos (modelo Raypa VCI-50) a baja intensidad de ultrasonidos. Tras esto, se aisló el ADN mediante el instrumento MagNA Pure LC 2.0 (Roche Diagnostics), usando el kit III de aislamiento de ADN MagNA Pure LC para bacterias y hongos (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante con una etapa adicional de lisis enzimática: a un sedimento de saliva en 100 µl de PBS, se añadieron 130 µl de tampón lisis y 2,5 µl de mezcla enzimática, que contenía 20 mg/ml de lisozima (Thermomixer comfort), 5 mg/l de lisostafina (Sigma-Aldrich) y 0,625 mg/ml de mutanolisina (Sigma-Aldrich), y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. El ADN se resuspendió en 100 µl de tampón de elución y se congeló a -20 °C hasta su posterior análisis. Para determinar la cantidad de ADN para secuenciación, se usó el kit de ensayo de ADNbc Quant-iT™ PicoGreen® (ThermoFisher) y un fluorómetro Qubit™ 3 (ThermoScientific), según las instrucciones del fabricante.

6.2. Secuenciación de ADNr 16

Se realizó una etapa de preamplificación de las regiones V1-V5 del gen de ARNr 16S, siguiendo a Dzidic *et al.*, 2019. Se realizó una biblioteca de amplicones de Illumina siguiendo el protocolo de preparación de bibliotecas de secuenciación metagenómica del gen de ARNr 16S de Illumina (Parte n.º 15044223 Rev. A). Las secuencias de cebadores específicas del gen usadas en este protocolo fueron el amplicón F de 16S (SEQ ID NO: 8) y el amplicón R de 16S (SEQ ID NO: 9), que se dirigen a las regiones V3 y V4 del gen del ADNr 16S, lo que dio lugar a un único amplicón de 460 pb. Las secuencias de adaptador saliente se usaron en conjunto para que fueran compatibles con los adaptadores de índice y secuenciación de Illumina. Tras la amplificación del gen del ADNr 16S, el ADN se secuenció en un secuenciador MiSeq según las instrucciones del fabricante (Illumina) usando el protocolo de 2x300 pb de extremos pareados.

6.3. Clasificación taxonómica

Las secuencias fueron analizadas de acuerdo con Boix-Amorós *et al.*, 2016. En resumen, las lecturas fueron filtradas por calidad y recortadas al final en ventanas de 10 pb con Prinseq. Las quimeras de PCR se eliminaron con UCHIME de acuerdo con Edgar *et al.*, 2011. Solo las secuencias filtradas >250 pb se usaron para ser asignadas taxonómicamente a nivel de género con el clasificador del Ribosomal Database Project (Wang *et al.*, 2007), usando un intervalo de confianza del 80 %. La selección de unidades taxonómicas operativas (UTO) se realizó con VSEARCH (Rognes, 2016) con un 97 % de identidad de secuencia. Cada UTO se alineó como centroide usando BLAST con un 97 % de identidad y una cobertura de consulta del 100 %, y se recuperaron solo aquellas especies que coincidían con la clasificación previa del centroide a nivel de género proporcionada por el clasificador RDP.

6.4. Análisis estadístico. Se usó el lenguaje de programación R general para el cálculo estadístico para realizar los análisis corriente abajo. Los géneros con una abundancia de <0,01 % se eliminaron de todos los grupos. Para el análisis multivariante, se usó una prueba de Adonis (Análisis multivariado permutacional de varianza usando matrices de distancia), proporcionada por la biblioteca Vegan de R (Oksanen, 2017), para comparar los grupos.

Para visualizar los grupos y sus diferencias en un mapa bidimensional, se calcularon los componentes principales restringidos mediante el análisis de correspondencia restringida (ACR), que también forma parte de la biblioteca Vegan. Para los análisis con una variable, se realizaron pruebas de Wilcoxon no paramétricas pareadas para comprobar las diferencias en géneros, UTOs y todos los demás parámetros entre grupos (5 h de control vs. 5 h de nitrato, y 9 h de control vs. 9 h de nitrato). Para las comparaciones taxonómicas se usaron valores p no ajustados.

Resultados

7. Efecto del nitrato en el crecimiento de una biopelícula

La adición de nitrato 6,5 mM (es decir, 403 mg/l) no mostró cambios significativos en las mediciones de impedancia en tiempo real del crecimiento de una biopelícula en comparación con las biopelículas de control (FIG. 1 A). De acuerdo con esto, los niveles de proteínas no difirieron significativamente entre las diferentes condiciones (FIG. 1 B).

8. Cambios en nitrato, nitrito, amonio, lactato y pH durante el crecimiento de una biopelícula

Se analizaron las mezclas de saliva y medio ICC con o sin nitrato 6,5 mM antes del crecimiento (0 h) y los sobrenadantes después de 5 h y 9 h de crecimiento. En 0 h, hubo diferencias en los parámetros medidos entre los donantes debido a las propiedades de la saliva específicas de cada persona (FIG. 2A-E).

En la condición con un nitrato 6,5 mM adicional (es decir, 403 mg/l), la mayor parte del nitrato se utilizó después de 5 h (FIG. 2A): en 7 individuos no había nitrato detectable después de 5 h, mientras que en los otros 5 donantes, el nitrato había disminuido un 76-85 %. El nitrito, a su vez, aumentó a partir de un promedio de 1,64 mg/l en 0 h a 64,68 mg/l a las 5 h, mientras que a las 9 h, la mayor parte se había metabolizado también (FIG. 2B).

Después de 5 h, el promedio de amonio había aumentado 1,72 veces en la condición de control y 2,21 veces en la condición de nitrato (ambas $p < 0,005$), y la diferencia entre las condiciones de nitrato y control era significativa ($p < 0,01$, FIG. 2C). Después de 9 h, el amonio había aumentado aún más en ambas condiciones ($p < 0,005$), siendo significativamente mayor en el grupo de nitrato ($p < 0,005$). El promedio de lactato aumentó de manera destacable después de 5 h en ambas condiciones (4,74x en la condición de control y 3,40x en la condición de nitrato, ambas $p < 0,005$), pero fue significativamente menor en la condición de nitrato ($p < 0,005$, FIG. 2D). Después de 9 h, el lactato parecía haber sido parcialmente metabolizado, disminuyendo significativamente en ambas condiciones ($p < 0,005$), pero se mantuvo significativamente más bajo en la condición de nitrato ($p < 0,005$). Hubo una correlación negativa entre el lactato y el amonio a las 9 h que fue más evidente en la condición de nitrato ($R = -0,71$, $p < 0,05$ en el control y $R = -0,87$, $p < 0,0005$ en la condición de nitrato).

De acuerdo con una mayor cantidad de producción de amonio y menores cantidades de lactato, el pH fue significativamente mayor en la condición de nitrato a las 5 h y 9 h (ambas, $p < 0,005$, FIG. 2E). Con respecto a esto, el pH cayó significativamente después de 5 h en la condición de control ($p < 0,005$), pero no en la condición de nitrato ($p = 0,056$). Resulta interesante que, a las 5 h, hubo una correlación negativa entre el pH y el nitrito en la condición de nitrato ($R = -0,82$, $p < 0,005$): los individuos con 0 mg/l de nitrito, posiblemente utilizados, tuvieron el pH más alto. Análogamente, en la condición de nitrato, el amonio se correlacionó negativamente con el nitrito a las 5 h ($R = -0,64$, $p < 0,05$).

Para ver si el nitrato tendría un efecto sobre la acidificación salival por el azúcar sin la presencia del medio

de cultivación, se incubó saliva no estimulada con 0,2 % de glucosa y un intervalo de concentración de nitrato de 0,5-8,5 mM durante 5 h (FIG. 3). El pH salival antes del crecimiento fue de 7,17 (DT 0,41). Tras 5 h de incubación con glucosa al 0,2 % sin nitrato, el pH cayó a pH 4,71 (DT 0,29, CL 4,49, CU 4,96). Todas las concentraciones de nitrato de 0,5 mM a 8,5 mM dieron lugar a un pH más alto después de 5 h en comparación con el nitrato 0 mM ($p < 0,05$ para 1 mM y 1,5 mM, $p < 0,01$ para concentraciones más altas de hasta 8,5 mM).

9. El nitrato afecta fuertemente a la composición de una biopelícula

La adición de nitrato tuvo un efecto significativo en la composición bacteriana de una biopelícula (análisis de agrupamientos de compuestos, AAC, valor p de Adonis: 0,001), explicando una gran proporción de la variabilidad de los datos independientemente del tiempo de muestreo de la biopelícula (FIG. 4).

En la condición de control, los cinco géneros más comunes tras 5 h de crecimiento de una biopelícula (Tabla 1) fueron *Streptococcus* (48,02 % DT 9,93 %), *Veillonella* (18,43 % DT 8,01 %), *Haemophilus* (7,33 % DT 4,52 %), *Neisseria* (6,56 % DT 2,98 %), y *Prevotella* (3,82 % DT 5,19 %/SE 1,50 %). En la condición de nitrato, los géneros más abundantes tras 5 h fueron *Streptococcus* (45,29 % DT 9,53 %), *Neisseria* (20,65 % DT 8,36 %), *Veillonella* (10,84 % DT 8,11 %), *Haemophilus* (7,30 % DT 4,27 %) y *Gemella* (2,03 % DT 1,60 %). A las 9 h los porcentajes cambiaron ligeramente, pero el orden de los 5 géneros más abundantes se mantuvo idéntico, con la excepción de *Prevotella* que fue ligeramente más prevalente que *Gemella* en la condición de nitrato. En la saliva usada como inóculo, se encontraron géneros dominantes comparables con un porcentaje similar de *Streptococcus* (43,38 %, DT 2,97 %) en primer lugar y luego *Neisseria*, *Gemella* y *Veillonella* (datos no mostrados).

Tabla 1: Abundancia bacteriana en las biopelículas bucales con y sin nitrato 6,5 mM

Género	5 h (n = 12)				9 h (n = 12)			
	Nitrato (%)		Control (%)		Nitrato (%)		Control (%)	
	Promedio	DT	Promedio	DT	Promedio	DT	Promedio	DT
<i>Streptococcus</i>	45,29	9,53	48,02	9,93	31,75	4,41	38,48	6,16
<i>Veillonella</i>	10,84	8,11	18,43	8,01	20,46	3,38	28,04	3,76
<i>Neisseria</i>	20,65	8,36	6,56	2,98	20,99	5,42	5,78	3,24
<i>Haemophilus</i>	7,30	4,27	7,33	4,52	8,86	3,89	8,37	3,60
<i>Prevotella</i>	1,99	3,43	3,82	5,19	2,78	4,63	3,37	5,22
<i>Gemella</i>	2,78	2,54	2,03	1,60	1,83	1,51	1,30	1,10
<i>Granulicatella</i>	2,16	1,60	2,38	1,34	1,56	0,73	1,85	0,76
<i>Pasteurellaceae</i> sin clasificar	2,00	3,08	2,22	3,88	2,12	2,30	2,19	3,14
<i>Porphyromonas</i>	0,56	0,37	1,11	0,99	1,51	1,05	1,88	1,37
<i>Fusobacterium</i>	0,15	0,14	0,40	0,33	0,38	0,25	1,17	1,27
<i>Neisseriaceae</i> sin clasificar	0,95	0,38	0,38	0,18	1,07	0,49	0,35	0,18
<i>Aggregatibacter</i>	0,55	0,72	0,59	1,30	0,72	0,93	0,34	0,40
<i>Leptotrichia</i>	0,14	0,12	0,61	1,10	0,18	0,31	0,28	0,25
<i>Veillonellaceae</i> sin clasificar	0,26	0,17	0,49	0,38	0,38	0,13	0,57	0,16
<i>Rothia</i>	0,53	0,52	0,23	0,27	0,25	0,24	0,13	0,12
<i>Alloprevotella</i>	0,21	0,29	0,50	0,70	0,37	0,48	0,51	0,58
Otros	3,64	1,59	4,89	3,27	4,80	3,92	5,39	4,02

La menor abundancia de *Veillonella* en la condición de nitrato en comparación con la condición de control fue significativa a las 5 h y a las 9 h ($p < 0,01$, FIG. 5), así como el menor porcentaje de *Streptococcus* a las 9 h ($p < 0,01$). Los géneros *Streptococcus* y *Veillonella* están ambos asociados a la caries (es decir, estos géneros aumentan en la caries). Resulta interesante que, se observara una variación de UTOs dentro de estos géneros,

incluyendo un aumento de *S. parasanguinis* a las 5 h y un aumento de *V. dispar* a las 9 h (ambas $p < 0,05$, datos no mostrados). El género *Prevotella* asociado a la periodontitis y a la halitosis a las 5 h fue menor en la condición de control (3,82 %, DT 5,19 % en comparación con 1,99 %, DT 3,43 % en la condición de nitrato, $p < 0,01$). A las 9 h, no se observaron diferencias significativas en *Prevotella* a nivel de género, pero a nivel de UTO, se observó un porcentaje relativamente mayor de la especie más abundante, *P. pallens*, en la condición de nitrato ($p < 0,05$, datos no mostrados). No se observaron diferencias significativas entre *Haemophilus* y *Gemella* en las dos condiciones.

El aumento de 3,5x a las 5 h y de 4,9x a las 9 h de *Neisseria* asociada a la salud en la condición de nitrato en comparación con la condición de control fue significativo (ambos $p < 0,01$, FIG. 5). Aunque el número de *Neisseria* aumentó claramente, las UTOs identificadas, *N. flavescens*, *N. subflava*, *N. bacilliformis*, y *N. elongata*, no cambiaron significativamente en su abundancia relativa. *Rothia*, otro género de reducción de nitrato asociado a la salud dominado por una UTO clasificada como "*R. aerea* o *R. dentocariosa*", fue menos abundante (es decir, promedio en todas las condiciones 0,3 % DT 0,34 %, intervalo 0,01-1,7 %), pero 2,7x mayor en la condición de nitrato a las 5 h y 9 h ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). Por último, el género *Kingella* asociado a la salud aumentó significativamente después de 5 h ($p < 0,05$). Curiosamente, *Rothia*, *Neisseria* y *Kingella* están asociadas a la salud desde el punto de vista de la caries, las enfermedades periodontales y la halitosis.

Otros géneros significativamente más bajos ($p < 0,05$ a las 5 h y/o 9 h) en la condición de nitrato fueron *Porphyromonas* asociada a la periodontitis y a la halitosis (incluyendo una UTO "*P. endodontalis* o taxón bucal 285"), *Fusobacterium* (incluyendo *F. periodonticum* y *F. nucleatum*), *Leptotrichia* (incluyendo una UTO "*L. wadei* o taxón bucal 417", y *L. hongkongensis*), *Avoprevotella* (incluyendo *A. rava* y *A. tanneriae*), *Dialister* y *Parvimonas*. De manera adicional, *Atopobium* y *Oribacterium* asociadas a la caries (incluyendo *O. parvum* y *O. sinus*) disminuyeron significativamente ($p < 0,05$ a las 5 h o a las 5 h y 9 h, respectivamente). También hubo una tendencia en la disminución de las bacterias asociadas a la periodontitis y a la halitosis *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Treponema*, *Tannerella*, *Solobacterium* y *Selenomonas*, pero la diferencia no fue significativa (FIG. 5).

Al agrupar las biopelículas secuenciadas de 12 donantes (D1-D12) en ambas condiciones (control y nitrato) en conjunto, *Leptotrichia* y *Oribacterium* se correlacionaron positivamente con lactato a las 5 h ($R = 0,72$ y $R = 0,70$, ambas $p < 0,05$). En la condición de nitrato, Veillonella se correlacionó negativamente con el pH a las 9 h ($R = -0,77$ y $R = -0,76$, respectivamente, ambas $p < 0,005$). En cambio, *Neisseria* se correlacionó positivamente con el pH a las 9 h en ambas condiciones (condición de control; $R = 0,75$, $p < 0,005$, condición de nitrato; $R = 0,84$, $p < 0,001$).

Conclusiones

10. Se analizaron los efectos de nitrato 6,5 mM durante el desarrollo de biopelículas bucales *in vitro*. Los resultados muestran que las biopelículas crecidas con nitrato contenían niveles varias veces superiores de los géneros *Neisseria* y *Rothia* asociados a la salud y de reducción de nitrato. Esto incluía un aumento de la abundancia total de *Rothia mucilaginosa* y *Neisseria flavescens*. Parece que las especies de *Rothia* y *Neisseria* tienen una ventaja selectiva en presencia de nitrato. *Neisseria* se correlaciona con mediadores antiinflamatorios y se asocia con una mejor recuperación de la gingiva tras una gingivitis experimental. También *Rothia* se relaciona

a menudo con la salud periodontal y *Rothia dentocariosa* se asoció recientemente con individuos libres de halitosis. De manera adicional, tanto *Rothia* como *Neisseria* se han asociado a individuos libres de caries. el aumento de *Neisseria* y *Rothia* puede considerarse un cambio positivo relacionado con la salud bucodental general.

11. Otra observación importante en los experimentos fue que *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Leptotrichia* y *Alloprevotella* asociadas a la enfermedad periodontal eran significativamente menores en las biopelículas crecidas con nitrato después de 5 h. *Porphyromonas*, *Fusobacterium* y *Prevotella* contienen especies de los clásicos "complejos rojo y naranja", que, en ese estudio, eran las bacterias con mayor asociación con la periodontitis, incluyendo *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* que también se identificaron en nuestro estudio. De forma análoga, *Leptotrichia* tiene una fuerte asociación con la periodontitis, mientras que muy recientemente se ha confirmado que *Alloprevotella* también es más abundante en la enfermedad. Es interesante observar que los otros dos miembros del "complejo rojo", a saber, *Tannerella* y *Treponema*, también se encontraron en niveles más bajos en la condición de nitrato, pero la diferencia no fue significativa.

Es interesante señalar que, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia* y *Prevotella* también se asocian a la halitosis, mal aliento resultante de la producción microbiana de compuestos sulfúricos volátiles (CSVs). Estos CSVs incluyen sulfuro de hidrógeno y metilmercaptano. Se sabe que el sulfuro de hidrógeno es genotóxico (es decir, daña el ADN de las células humanas) y causa inflamación en el colon y la boca. Con respecto a esto, se cree que la producción de sulfuro de hidrógeno contribuye al desarrollo de enfermedades periodontales, vinculando la halitosis con la periodontitis.

12. Otros géneros que mostraron una tendencia a la disminución en la condición de nitrato fueron *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Solobacterium* y *Selenomonas*, todos ellos asociados con la periodontitis y la halitosis. Resumiendo, la adición de nitrato disminuye la abundancia de especies asociadas a las enfermedades periodontales y a la halitosis.

13. Los datos también muestran que se produjo menos lactato y más amonio a las 5 h y a las 9 h en la condición de nitrato, y, por consiguiente, el pH fue mayor que en la condición de control (todos $p < 0,01$). De manera adicional, hubo una fuerte correlación negativa entre el lactato y el amonio después de 9 h de crecimiento de la biopelícula, que fue más evidente en la condición de nitrato. Esto apoya la hipótesis de que la producción de álcali y el consumo de lactato por parte de las comunidades de reducción de nitrato limitan la caída del pH cuando se fermentan los carbohidratos. *In vivo*, esto podría reducir potencialmente el tiempo que el tejido dental está bajo un pH desmineralizador, un factor crítico para la caries dental. En este estudio, se descubre que las concentraciones de nitrato a partir de 0,5 mM impidieron la acidificación salival debido a la fermentación de la glucosa después de 5 h, mientras que no se observaron beneficios adicionales para concentraciones superiores a 3,5 mM.

14. En cuanto a la composición bacteriana, se observó una disminución de *Veillonella*, *Streptococcus*, *Atopobium* *Oribacterium*, que son géneros asociados al lactato, la acidificación y la caries en la condición de nitrato después de 5 h o 9 h ($p < 0,05$).

15. El metabolismo de nitrito y la producción de amonio en este estudio indican una actividad de reducción disimilatoria del nitrato al amonio (RDNA) por parte de las especies bucales. La observación de que el nitrito se correlacionó negativamente con el amonio y el pH a las 5 h (las biopelículas que metabolizaron todo el nitrito

produjeron la mayor parte del amonio y tuvieron el pH más alto) apoya aún más esto. En la condición de nitrato, la cantidad de amonio después de 9 h era 4,75 mM mayor que en la condición de control. Estequiométricamente, esto podría explicar el 73,1 % de los 6,5 mM de nitrato añadido, mientras que (parte de) el otro 26,9 % de nitrato debe haber sido desnitrificado en óxido nítrico y otros productos nitrogenados.

16. Por lo tanto, la administración de nitrato se usa como un prebiótico que es convertido por ciertos microorganismos bucales en amonio, aumentando el pH local y teniendo así un efecto anticaries *in vivo*. Aparte de la producción de amonio, la conversión de nitrito en óxido nítrico podría limitar aún más el desarrollo de la caries. En el caso de la periodontitis, el aporte complementario de nitrato podría conducir a la producción de óxido nítrico, limitando el crecimiento de las especies periopatógenas. Esto supone una ventaja en comparación con el aporte complementario de arginina que aumenta las bacterias periopatógenas, como *Treponema*, *Prevotella* y *Eubacterium* (Koopman *et al.*, 2016).

17. Los resultados en este estudio mostraron que el nitrato causó una variación estructural y funcional en las comunidades bucales que sería beneficioso para el huésped humano. Basándose en los resultados, puede concluirse que el nitrato es necesario para una microbiota bucal saludable y podría usarse como prebiótico, reduciendo los niveles de especies cariogénicas, periopatógenas y asociadas a la halitosis, al tiempo que se aumentan los niveles de especies de reducción de nitrato asociadas a la salud. La fuerza de esta variación en la composición de una biopelícula se reflejó en la observación de que el nitrato podía explicar una gran proporción de la variabilidad de los datos en la composición bacteriana, independientemente del tiempo de muestreo de la biopelícula. De manera adicional, se concluye que el metabolismo del nitrato proporciona resiliencia a la acidificación resultante del metabolismo del azúcar al aumentar el consumo de lactato y la producción de amonio. En las biopelículas crecidas con nitrato, *Veillonella*, un género que usa el lactato como fuente de carbono, se correlacionó negativamente con el pH y positivamente con *Neisseria*. *Neisseria*, *Rothia* y *Kingella* desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de una relación simbiótica saludable entre la microbiota bucal y el huésped mediante la reducción del nitrato salival.

EJEMPLO 2: Estudio in vivo - administración oral de nitrato a personas humanas

Visión general: Se realizaron estudios clínicos en los que se obtuvo la primera evidencia *in vivo* de que un complemento rico en nitrato afecta a la actividad bacteriana directamente tras una única ingesta (es decir, un efecto agudo). Se demostró que este efecto se produce por aplicación tópica y por ingestión del producto.

18. Métodos

Estudio 1: Efecto tópico (directo) e ingerido (indirecto) sobre el nitrato salival

El nitrato se midió como en el EJEMPLO 1 en diferentes muestras de saliva, recogidas cada 30 minutos durante un período de 6 horas, de un individuo en condiciones de ayuno, tras la ingestión de 220 mg de nitrato en 200 ml de volumen.

Estudio 2: Efecto de una composición tópica de nitrato sobre la actividad bacteriana

Se midió el nitrato, el nitrito y el pH como en el EJEMPLO 1, en diferentes muestras de saliva recogidas de 6 individuos de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Recoger la saliva antes y 10 minutos después de un enjuague con sucrosa al 10 %

- Ingerir un complemento rico en nitrato altamente concentrado (300 mg de nitrato en 70 ml de volumen)
- Esperar 1 hora sin comer ni beber
- Recoger la saliva antes y 10 minutos después de un enjuague con sucrosa al 10 %.

Estudio 3: Efecto de una composición de nitrato ingerida sobre la actividad bacteriana

5 Se midió el nitrato, el nitrito y el pH como en el EJEMPLO 1, en diferentes muestras bucales recogidas de 6 individuos de acuerdo con el siguiente protocolo:

Día 1 (día de control)

- Recoger una muestra de saliva por la mañana, antes y 10 minutos después de un enjuague con sucrosa al 10 %.
- 10 - Esperar 4 hora sin comer
- Recoger la muestra de saliva antes y 10 minutos después de un enjuague con sucrosa al 10 %

Día 2 (día del complemento)

Por la mañana:

- Recoger una muestra de saliva por la mañana, antes y 10 minutos después de un enjuague con sucrosa al 10 %.
- 15 al 10 %.
- Tomar el complemento rico en nitrato (220 mg por dosis)
- Esperar 4 horas sin comer y recoger muestras de saliva cada hora (muestras a las 1 h, 2 h y 3 h)
- Recoger saliva a las 4 horas, antes y 10 minutos después de un enjuague con sucrosa al 10 %.

20 Estudio 4: Comparación del efecto de una composición de nitrato ingerida y un placebo (estudio transversal con enmascaramiento)

Se midió el nitrato, el nitrito y el pH como en el EJEMPLO 1, en diferentes muestras bucales recogidas de 12 individuos de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Recoger una muestra de saliva por la mañana, antes y 10 minutos después de un enjuague con sucrosa al 10 %.
- 25 - Tomar un complemento rico en nitrato (250 mg de nitrato en 200 ml de agua) o placebo (0 mg de nitrato en 200 ml de agua)
- Esperar 1 h 45 min sin comer ni beber
- Recoger la muestra de saliva antes y 10 minutos después de un enjuague con sucrosa al 10 %.

19. Resultados

30 En el Estudio 1, se analizó cómo un complemento rico en nitrato afecta a los niveles de nitrato salival (FIG. 6). Los datos muestran un aumento directo del nitrato salival tras el consumo del complemento como consecuencia del contacto tópico del producto con los tejidos bucales, que se reduce lentamente por el aclaramiento de la saliva y la deglución. Se observa un segundo pico después de 2,5 horas, como consecuencia de la actividad de reciclaje de las glándulas salivales, que concentran el nitrato del plasma en la saliva, lo que da lugar a concentraciones elevadas de nitrato durante las 6 horas de prueba.

Por tanto, el Estudio 2 y el Estudio 3 se realizaron para estudiar el efecto agudo de un uso único de un producto que contiene nitrato sobre la actividad bacteriana durante el aumento de nitrato salival directo

(administración tópica) e indirecto (administración ingerida), respectivamente. Para ello, se analizó el efecto de los complementos ricos en nitrato sobre el metabolismo acidogénico bacteriano resultante de un enjuague con un 10 % de azúcar, que disminuye el pH salival. Las mediciones de pH, nitrato y nitrito previas y posteriores al azúcar en las muestras de saliva basales y posteriores al complemento en estos dos estudios se muestran en la Tabla 2.

5 **Tabla 2:** Niveles de nitrato salival, nitrito y pH en los Estudios 2 y 3.

Estudio		Estudio 2 (n = 6)		Estudio 3 (n = 6)			
Dosis de nitrato		300 mg en 70 ml		220 mg en ≥ 150 ml		Ninguno (día de control)	
Punto temporal		Valor inicial	1 h	Valor inicial	4 h	Valor inicial	4 h
Nitrato (mg/l)	previo al azúcar	120,0	546,7	13,3	45,8	-	-
	posterior al azúcar	58,3	388,3	11,7	32,5	-	-
Nitrito (mg/l)	previo al azúcar	13,2	53,3	9,8	17,3	-	-
	posterior al azúcar	5,5	71,5	8,2	10,4	-	-
pH	previo al azúcar	6,95	6,97	6,98	7,32	6,95	7,18
	posterior al azúcar	6,58	6,73	6,52	6,87	6,57	6,57

Ambos estudios mostraron que el nitrato y el nitrito siempre aumentaron significativamente después del complemento y que el nitrato y el nitrito siempre disminuyeron significativamente justo después del enjuague con azúcar. Esto indicó que una dosis única de nitrato tenía un efecto agudo en los niveles salivales de nitrato y que tenía un efecto agudo en la actividad microbiana al inducir la actividad de reducción de nitrato y de reducción de nitrito.

En cuanto a los valores de pH, en el Estudio 2 se observó que 1 hora después de la ingesta de un complemento concentrado, el nitrato ya impedía la segunda caída del pH por el enjuague con azúcar (FIG. 7A). Sin embargo, el pH salival basal no aumentó significativamente. En el Estudio 3, los datos mostraron que después de 4 h, el pH basal aumentó significativamente (FIG. 7B). De manera adicional, la caída del pH después de tomar el complemento ya no era significativa. Por lo tanto, los datos mostraron que el efecto de una composición de nitrato administrada tópicamente sobre la actividad bacteriana es significativo, pero menos fuerte que el efecto indirecto de una composición de nitrato ingerida, y que el fuerte efecto observado después de 4 horas *in vivo* coincide con el observado en el EJEMPLO 1 *ex vivo*.

En el Estudio 4, la caída del pH después del complemento de nitrato en comparación con el complemento de placebo fue limitada (FIG. 8B). De manera adicional, hubo una tendencia de aumento del pH basal ($p = 0,098$, FIG. 8A). Estos datos indicaron que una composición de nitrato requiere un efecto indirecto como consecuencia de la ingestión para influir en los cambios basales en la actividad bacteriana, mientras que una composición de nitrato administrada por vía tópica es suficiente para influir en los cambios posteriores al azúcar en la actividad bacteriana. Asimismo, el efecto significativo del complemento en comparación con el placebo confirmó que el efecto observado *in vivo* se debe al nitrato y no a la ingestión de agua.

20. Conclusiones

Los datos obtenidos en los diferentes Estudios *in vivo* demostraron que, tras una única aplicación de un complemento de nitrato, se detectan nitrato y nitrito en la saliva, y que caen instantáneamente tras un enjuague

con azúcar (solo 10 minutos de tiempo). Asimismo, una sola administración de nitrato siempre mitigaba la caída del pH tras un enjuague con azúcar. Esto implica que una sola aplicación de un producto con nitrato es suficiente para modificar la actividad de la microbiota bucal, proporcionando resiliencia frente a la acidificación. Esta resiliencia puede aumentarse esperando más tiempo (4 h) para que las bacterias de reducción de nitrato hayan aumentado, como se observó *ex vivo* después de 5 h (EJEMPLO 1). Los posibles mecanismos que impiden la caída del pH posterior al azúcar incluyen la producción del amonio neutralizador de ácidos, la producción de la molécula antimicrobiana óxido nítrico y el consumo de lactato por parte de las bacterias de reducción de nitrato, como se muestra en el EJEMPLO 1. Por tanto, nuestros resultados *in vivo* apoyan los resultados *ex vivo* mostrados en el EJEMPLO 1: una aplicación aguda de nitrato limita las caídas de pH y, por tanto, podría ser un prebiótico eficaz contra la caries, al reducir la disbiosis bacteriana asociada al azúcar, que es el principal desencadenante de una enfermedad de caries dental.

Sin quedar limitado a la teoría, fue una sorpresa para los presentes inventores que se produjera una mejora (alcalinización) del pH salival tanto antes como después de un enjuague con azúcar y también que esta mejora se observara de forma aguda después de 1-4 horas. El enjuague con azúcar simula una comida, donde se sabe que el pH disminuye; por consiguiente, este ejemplo muestra sorprendentemente que la administración de nitrato puede proporcionar una protección de una caída del pH, p. ej., después de una comida. Además, los resultados proporcionan evidencias *in vivo* de que los niveles de nitrato en la saliva permanecen en concentraciones elevadas (es decir, por encima de los niveles en ayunas de donantes) durante un período de al menos 6 horas. Esto hace que sea plausible que, p. ej., un complemento alimenticio, una pasta de dientes o un comprimido que contenga nitrato tenga un efecto positivo para reducir la disbiosis bucal después de una única dosis y en 24 horas, es decir, un efecto agudo, a diferencia del estado actual de la técnica, donde los cambios en la composición de la microbiota bucal *in vivo* solo se muestran después de 1-4 semanas de tratamiento, es decir, un efecto crónico. De manera adicional, las dosis de 220 mg y 250 mg (por debajo de la IDA de un adulto de 60 o 70 kg, respectivamente) de nitrato fueron suficientes para evitar una caída del pH debido al metabolismo del azúcar, mientras que en la técnica anterior, las dosis diarias usadas durante 1-4 semanas fueron de 372-770 mg (1,7-3,5x la IDA para un adulto de 60 kg).

EJEMPLO 3: Aislamiento de especies de reducción de nitrato a partir de donantes sanos para su uso como probióticos

Materiales y métodos

21. Selección de donantes y procedimiento de muestras

Se reclutaron como donantes sujetos sin caries ni periodontitis. Todos los participantes debían tener una buena salud bucodental, que fue evaluada por un dentista, y una presión arterial saludable, que se midió con un monitor automático de presión arterial modelo M6 Comfort IT (OMRON Healthcare Europe B.V). Las muestras de placa o de recubrimiento lingual fueron recogidas por un dentista y resuspendidas en 1 ml de PBS.

22. Aislamiento de especies de reducción de nitrato

Las muestras de placa o lengua en PBS se diluyeron de 10^2 a 10^7 veces y se colocaron en placas de agar infusión de cerebro y corazón (ICC) al 1,4 % (Merck Millipore). Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 días

para obtener colonias separadas en algunas de las diluciones. Se empleó un protocolo adaptado de Doel *et al.*, 2005 y Mashimo *et al.*, 2015 para detectar la actividad de reducción de nitrato directamente en las placas. Consiste en un método de superposición de agar doble basado en la reacción de Griess que tiñe el nitrito. Las colonias con capacidad de reducción de nitrato produjeron un color rojo debido a la presencia de nitrito. Estas colonias se transfirieron luego a nuevas placas de agar ICC y se incubaron durante 2 días más a 37 °C. La capacidad de reducción de nitrato de los aislados se confirmó repitiendo el método de superposición de agar doble para cada aislado. Posteriormente, se pasó una colonia a 5 ml de ICC líquido y se incubó aeróbicamente durante 2 días a 37 °C. Después de 2 días, se usó parte del medio para crear una reserva de glicerol de cada aislado para futuros experimentos. El resto del medio se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min y el sedimento se suspendió en 100 µl de PBS y se almacenó a -20 °C hasta la extracción del ADN.

23. Extracción de ADN de los aislados de reducción de nitrato y clasificación taxonómica

La extracción de ADN se realizó usando el kit III de aislamiento de ADN MagNA Pure LC (Bacterias, Hongos) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante, y las concentraciones de ADN se midieron usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Se realizó una PCR para amplificar el gen de ARNr 16S de cada aislado, usando los cebadores universales 8-F y 785-R para el gen de ARNr 16S, que comprenden las regiones hipervariables V1-V2-V3-V4 (SEQ ID NO: 9 y 10). A continuación, los productos de la PCR se purificaron usando placas de filtro planas de 96 pocillos (NucleoFast 96 PCR, Macherey-Nagel) y se secuenciaron mediante la tecnología Sanger. Para asignar taxonómicamente los aislados, las secuencias se analizaron usando BLASTn contra las secuencias de ARN ribosomal 16S en la base de datos NCBI nr.

24. Prueba de reducción de nitrato de aislados bacterianos

Las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio (el ion de amoniaco) en el medio gastado para determinar la capacidad de cada aislado de reducir o producir estos compuestos. Para ello, los aislados se sacaron de sus reservas y se incubaron en 5 ml de medio líquido ICC durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, los aislados se diluyeron en ICC hasta una DO de 0,01 y una concentración final de nitrato de 6,5 mM. Después, se incubaron los tubos durante 7 horas y se tomó 1 ml a las 4 y a las 7 horas después de agitar en vórtex. Se midió la DO a las 4 y 7 horas y las muestras se congelaron a -20 °C antes de realizar otras mediciones. El mismo experimento se realizó con 5 h de crecimiento usando tres tipos de medio tamponado (MES 100 mM, pH 6,0; HEPES 100 mM, pH 7,0; HEPES 100 mM pH 7,5) para mantener un pH estable y ver el efecto de los diferentes niveles de pH en la capacidad de reducción de nitrato de una selección de aislados.

25. Mediciones de nitrato, nitrito, amonio y pH

El nitrato, el nitrito, el amonio y el pH se midieron con un reflectómetro como se describe en el EJEMPLO 1.

25.1. Efecto de los aislados en las biopelículas *in vitro*

Se estudiaron *in vitro* seis aislados seleccionados como los mejores probióticos potenciales en función de los resultados de experimentos anteriores para definir el efecto de estos aislados cuando se añaden a una biopelícula bucal. Estos aislados se analizaron al hacerlos crecer con saliva de dos donantes diferentes (D2 y D25

en nuestra base de datos) en una placa de 96 pocillos. Para cada experimento, había 4 condiciones: control, nitrato (es decir, nitrato 6,5 mM), control + aislado, y nitrato + aislado. Para todas las muestras preparadas por duplicado, se añadieron 100 µl de ICC (con 0,05 mg/l de hemina, 0,005 mg/l de menadiona y vitamina K 0,2 mM) a cada pocillo. Después, se añadieron 100 µl de saliva (o ICC para los controles negativos) y, para las condiciones de nitrato, se añadieron 10 µl de solución de nitrato 65 mM (o 10 µl de ICC para las condiciones de control). En cada experimento se añadieron controles negativos: solo medio ICC y medio ICC + nitrato. Antes de añadirlos a la placa de 96 pocillos, los aislados crecieron durante 24 h. Después, se añadieron 40 µl de aislados en solución ICC con DO 1,5 (o 40 µl de solo ICC en condiciones sin aislados) a cada pocillo. La concentración final de nitrato fue de 6,5 mM y la DO inicial del aislado fue de 0,24. La placa de 96 pocillos se selló para evitar la presencia de oxígeno y se incubó durante 5 h 30 min a 37 °C. Después de eso, se recogió el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 30 µl de PBS y se almacenaron a -20 °C hasta que se realizaron las mediciones. Se extrajo el ADN y se secuenciaron las biopelículas como se describe en el EJEMPLO 1.

Resultados

26. Identificación de las especies de reducción de nitrato

Se cultivaron en placas muestras de lengua y placa de 5 donantes sanos diferentes. Las colonias que reducen el nitrato se detectaron por un tono rojo, resultante de una reacción de Griess. En total, se identificaron reservas de 67 aislados de reducción de nitrato.

27. Selección del mejor aislado probiótico basado en la capacidad de reducción de nitrato

Cada aislado redujo diferentes porcentajes de nitrato al incubarlos con 6,5 mM de nitrato durante 4 y 7 horas. Solo D3T4 redujo el 100 % del nitrato tras 4 horas de incubación. En cambio, otros seis aislados no habían reducido ningún porcentaje de nitrato en este tiempo y fueron descartados (FIG. 9A).

Se seleccionaron treinta y tres aislados que habían reducido el 100 % del nitrato a las 7 horas y >19 % del nitrato a las 4 horas (FIG. 9B). De estos 33 aislados, se seleccionaron 5 aislados de la lengua (L) y 5 aislados de la placa (P) que no redujeron el pH del medio por debajo de 6,8 (es decir, no eran acidogénicos) y tuvieron una buena tasa de crecimiento (densidad óptica superior a 0,7 tras 7 horas de incubación). Por otra parte, entre los aislados que cumplían los requisitos, se seleccionaron diferentes especies de distintos donantes. Los aislados seleccionados para continuar con nuestros estudios fueron D1P7 (CECT9999), D1P10, D1P15A, D1P17 (CECT30000), D3T4 (CECT30001), D4P7, D4T4 (CECT30002), D4T6 (CECT30003), D4T9 (CECT30004), D5T11A (CECT30005).

28. Capacidad de reducción de nitrato dependiendo del pH

Cuando los 10 aislados seleccionados se incubaron durante 5 horas con 6,5 mM de nitrato en tres niveles diferentes de pH (pH 6,0, 7,0 y 7,5), se demostró que la capacidad de reducción de nitrato difería entre los valores de pH y esto dependía del aislado. Por ejemplo, el aislado D1P7 redujo el 100 % del nitrato tras 5 horas de incubación a un pH de 7,5, pero solo redujo alrededor del 52 % del nitrato cuando el pH era de 6,0. Al contrario que D1P7, D4T6 redujo el 77 % del nitrato cuando el pH era de 6,0, pero solo redujo el 35 % del nitrato a un pH de 7,5 (FIG. 10A, Tabla 3).

La cantidad de nitrito que se redujo además a óxido nítrico y otros compuestos, expresada como

porcentaje del nitrato reducido después de 5 h de incubación, varió en función del pH (FIG. 10B). Algunos de los aislados convirtieron la mayor parte del nitrito en óxido nítrico u otros compuestos, pero el nivel óptimo de pH difirió entre los aislados. A pH 6, se estimuló la reducción de nitrito en comparación con pH 7 y 7,5 ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente), pero el grado de reducción de nitrito también dependía de la cepa.

Se determinó qué parte del porcentaje de nitrato reducido después de 5 h (FIG. 10A) se detectó como nitrito, teniendo en cuenta una reacción molar 1:1 (Tabla 3). El resto del nitrato reducido, que no se detectó como nitrito, se había reducido posteriormente a otros compuestos. El nitrito puede reducirse a amoníaco y óxido nítrico. Los aislados que producían la mayor parte del nitrito se consideraron adecuados para aplicaciones sistémicas (p. ej., para reducir la hipertensión), mientras que los aislados que producían la mayor parte del óxido nítrico y otros compuestos se consideraron adecuados para prevenir enfermedades bucales. El pH al que se detectaron estos compuestos determinó además para qué enfermedad bucal preferida sería adecuado cada aislado (las caries son causadas por un pH ácido, mientras que las enfermedades periodontales y la halitosis se producen a niveles de pH neutro o ligeramente alcalino).

Tabla 3. Nitrito y óxido nítrico producidos por los aislados crecidos a pH diferente durante 5 h con nitrato 6,5 mM.

Aislado	Especie (16S)	Nitrato reducido (NO3R) en:	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	Aplicaciones adecuadas
D1P7 (CECT9999*1)	<i>Rothia aeria</i>	NO3R total (%)	52*	-	100*	Enfermedades periodontales (perio.*3/salud bucodental general)
		% de nitrito	18	-	78*	
		% de óxido nítrico*2	34	-	22*	
D1P10	<i>Rothia dentocariosa</i>	NO3R total (%)	48	47	23	Caries
		% de nitrito	14	24	21	
		% de óxido nítrico*2	34*	23*	2	
D1P15A	<i>Rothia dentocariosa</i>	NO3R total (%)	50	53	43	Salud bucodental general
		% de nitrito	16	33,5	24	
		% de óxido nítrico*2	34*	19,5	19*	
D1P17 (CECT30000)	<i>Rothia dentocariosa</i>	NO3R total (%)	48	49	49	Aplicaciones sistémicas
		% de nitrito	19,5*	33	34*	
		% de óxido nítrico*2	28,5	16	15	
D3T4 (CECT30001)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	34	61*	69*	Perio. /aplicaciones sistémicas
		% de nitrito	12,5	39*	50*	
		% de óxido nítrico*2	21,5	22*	19*	
D4P7	<i>Rothia dentocariosa</i>	NO3R total (%)	53*	46	48	Salud bucodental general
		% de nitrito	14	31	25,5	
		% de óxido nítrico*2	39*	15	22,5*	
D4T4 (CECT30002)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	52*	55	52*	Aplicaciones sistémicas
		% de nitrito	19*	44*	36*	
		% de óxido nítrico*2	33	11	16	
D4T6		NO3R total (%)	77*	66*	35	Caries

Aislado	Especie (16S)	Nitrato reducido (NO3R) en:	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	Aplicaciones adecuadas
(CECT30003)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	% de nitrito	38*	37*	32	
		% de óxido nítrico* ²	39*	29*	3	
D4T9 (CECT30004)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	59*	67*	57*	Salud bucodental general
		% de nitrito	21,5*	33	29	
		% de óxido nítrico* ²	37,5*	34*	28*	
D5T11A (CECT30005)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	48	55	78*	Aplicaciones sistémicas
		% de nitrito	18*	38*	59,5*	
		% de óxido nítrico* ²	30	17	18,5	
Medias	-	NO3R total (%)	51	55	51	-
	-	% de nitrito	18	33	33	-
	-	% de óxido nítrico* ²	34	19	18	-

*número por encima de la media

*1 registrado en la colección de cultivos e incluido en esta patente

*2 óxido nítrico y otros compuestos que pueden resultar de la reducción de nitrito (p. ej., amonio)

*3 debido a la degradación de las proteínas, la halitosis también se produce a un pH neutro a alcalino y se pueden

5 aplicar los mismos probióticos propuestos para las enfermedades periodontales

29. Efectos de los aislados en el desarrollo de una biopelícula bucal

Se comprobó *in vitro* el efecto de seis de los 10 aislados seleccionados (cinco de *Rothia mucilaginosa* y uno de *Rothia aeria*) sobre el desarrollo de biopelículas bucales. Para ello, crecieron biopelículas a partir de la saliva de dos donantes diferentes (denominados con los códigos D2 y D25, FIG. 11) durante 5 h 30 min. Los aislados, que se añadieron desde el principio, parecían colonizar las biopelículas de forma satisfactoria, según lo indicado por los porcentajes finales de sus correspondientes especies detectadas por secuenciación (Tabla 4). Todos los aislados crecieron mejor en presencia de nitrato. Se compararon las biopelículas crecidas con y sin nitrato en presencia o ausencia de los aislados (FIG. 11). De manera adicional, los resultados se compararon con los controles del medio de crecimiento con y sin nitrato (Cnt, FIG. 11).

Tabla 4: Porcentaje de probióticos en las biopelículas a las 5 h de crecimiento tras la aplicación del probiótico en muestras de dos donantes con diferentes CRNs

Aislado	Condición	Donante 2		Donante 25	
		<i>R. mucilaginosa</i> (%)	<i>R. aeria</i> (%)	<i>R. mucilaginosa</i> (%)	<i>R. aeria</i> (%)
Ninguno	Control	4,48	0,09	5,11	0,03
	Nitrato	2,33	0,06	7,94	0,03
D1P7 (CECT9999)	Control	0,85	10,13	0,15	32,34
	Nitrato	2,64	17,49	0,36	41,09
D3T4 (CECT30001)	Control	22,08	0,02	37,15	0,00
	Nitrato	26,36	0,04	45,83	0,00
D4T4	Control	17,14	0,02	47,43	0,00

(CECT30002)	Nitrato	27,95	0,04	58,63	0,00
D4T6 (CECT30003)	Control	15,23	0,03	33,74	0,00
	Nitrato	24,53	0,05	58,14	0,00
D4T9 (CECT30004)	Control	19,96	0,03	42,43	0,00
	Nitrato	34,12	0,04	54,53	0,00
D5T11A (CECT30005)	Control	5,14	0,04	35,15	0,00
	Nitrato	14,43	0,04	40,72	0,00

30. Adición de aislados a un donante sin CRN bucal (D25)

En la biopelícula bucal *in vitro* crecida a partir de la saliva de D25, que tenía un pH alcalino (pH 7,8 antes de su mezcla 1:1 con el medio de crecimiento), el nitrato no disminuyó en comparación con el control y se produjo poco nitrato, lo que demuestra que la microbiota bucal de este donante tenía una capacidad de reducción de nitrato (CRN) drásticamente baja. Sin embargo, un gran porcentaje de nitrato se redujo en la condición de nitrato + aislado (FIG. 11 E) y la concentración de nitrito también aumentó de manera destacable (FIG. 11 F). Esto indica que la adición de un probiótico fue capaz de compensar la falta de capacidad de reducción de nitrato.

La concentración de nitrato fue mayor cuando se añadió nitrato a la saliva en ICC (FIG. 11 E, Ninguno, barras negras) que cuando se añadió nitrato solo a ICC (Ninguno, FIG. 11E, Cnt, barras negras rayadas), lo que indica que la saliva contenía algo de nitrato. El pH se mantuvo estable cuando se añadió nitrato a la saliva (condición de nitrato), pero disminuyó cuando se añadieron aislados sin nitrato. Cuando se añaden los aislados y el nitrato en conjunto, el pH cayó significativamente menos ($p < 0,05$), y para algunos aislados incluso aumentó (p. ej., D3T4, FIG. 11G).

31. Adición de aislados a un donante con CRN bucal normal (D2)

Cuando se realizó el mismo experimento con la saliva del donante D2, que tenía un pH salival más bajo (pH 6,8 antes de la mezcla 1:1 con el medio de crecimiento ICC), se demostró que el pH aumentaba al añadir nitrato en presencia o ausencia de aislados (FIG. 11C). En un caso (D3T4), la adición del aislado junto con el nitrato aumentó el pH más que el nitrato solo. Resulta interesante que, los aislados sin nitrato también parecieron evitar una caída del pH en comparación con la condición de control para este donante.

Las biopelículas de D2 crecidas con nitrato casi redujeron todo el nitrato después de 5 h 30 min, incluso cuando no se añadieron aislados. Esto sugiere que el donante tiene una buena capacidad de reducción de nitrato y que la adición de nitrato por sí sola es suficiente para promover su reducción.

En el caso de ambos donantes, al agrupar todos los aislados, el pH fue significativamente mayor en presencia de nitrato que en ausencia de nitrato ($p < 0,05$). Con respecto al amonio, las concentraciones de amonio fueron similares en todas las condiciones para ambos donantes y no se observaron cambios significativos (FIG. 11D y H). Otros factores que explican la prevención de la caída del pH cuando se reduce el nitrato son el consumo de lactato y la producción aparente de óxido nítrico, como se observó en el EJEMPLO 1.

Conclusiones

32. Los aislados que reducían más el nitrito a otros compuestos se seleccionaron como probióticos potenciales contra las enfermedades bucales, teniendo en cuenta que se podía producir óxido nítrico, que es un compuesto antimicrobiano (especialmente contra los anaerobios estrictos), y que también se podía producir

amoniaco (que tamponaría el pH ácido). Dependiendo del nivel de pH en el que el aislado redujera el nitrito a otros compuestos, se seleccionó una aplicación preferente, a saber, la salud bucodental general (todos los niveles de pH: D1P15A, D4P7, D4T9), la caries (pH ácido: D1P10, D4T6) o las enfermedades periodontales y la halitosis (pH neutro a ligeramente alcalino: D1P7, D3T4). Los aislados que producían más nitrito (D1P17, D3T4, D4T4, D5T11A) se consideraron adecuados para aumentar los niveles de óxido nítrico sistémico mediante la ingestión de nitrito. Se ha demostrado que esto tiene un amplio intervalo de beneficios, incluyendo la disminución de la presión arterial, mejora de la función endotelial, aumento del rendimiento deportivo y la reversión del síndrome metabólico, así como los efectos antidiabéticos (Lundberg *et al.*, 2018). Notablemente, los aislados a diferentes niveles de pH también se analizaron solos. Al añadir los aislados a una biopelícula bucal, otras bacterias podrían reducir aún más el nitrito, lo que puede conducir a beneficios locales y a la prevención de enfermedades bucales. Aparte del óxido nítrico, se puede producir amonio que puede prevenir el desarrollo de caries como se describe en el EJEMPLO 1.

33. Todos estos resultados muestran que se pueden encontrar diferentes tipos de bacterias de reducción de nitrato en la cavidad bucal de diferentes individuos. Estos aislados de reducción de nitrato podrían usarse como probióticos y simbióticos (es decir, los probióticos y una fuente de nitrato como prebiótico) con el fin de aumentar las capacidades de reducción de nitrato y nitrito de los individuos con una capacidad de reducción de nitrato alterada, como se ha mostrado para el individuo D25 anteriormente. Un aumento de las capacidades de reducción de nitrato y nitrito podría mejorar la salud bucal y cardiovascular, pero para algunos individuos, el nitrato por sí solo podría ser suficiente para lograr un estado asociado a la salud, como se muestra en los ejemplos anteriores para el individuo D2. Por tanto, podría dirigirse un tratamiento personalizado con nitrato como prebiótico, un probiótico de reducción de nitrato o un simbiótico (pre- + probiótico) dependiendo de la CRN de un individuo determinado.

EJEMPLO 4: Productos y formas de administración

4.1. Aplicación del complemento de extracto vegetal rico en nitrato (efecto directo e indirecto)

Los participantes se lavaron los dientes por la mañana como de costumbre. Después, de un frasco con 92 g de complemento de extracto de remolacha/vitamina C/molibdeno (Tabla 5), se tomó una dosis de 11,5 g usando una cuchara de plástico proporcionada con el frasco y llenándola hasta la línea de 25 ml. La dosis se disolvió en 200 ml de agua, se mezcló y se ingirió. Una dosis de complemento contiene 250 mg (es decir, por debajo de 259 mg de la IDA para un adulto de 70 kg) de nitrato presente de forma natural en el extracto de remolacha y las dosis actuales recomendadas diariamente de vitamina C (80 mg) y molibdeno (50 µg) para adultos. La vitamina C es un antioxidante que estimula la reducción del nitrito a óxido nítrico, evitando la formación de compuestos N-nitrosos tóxicos, y el molibdeno es un cofactor de las enzimas bacterianas de reducción de nitrato. La combinación de estas moléculas estimula la desnitrificación, especialmente en los individuos que carecen de estos nutrientes. En dos individuos, se midió el nitrato cada hora durante 5 horas y la concentración de nitrato salival permaneció elevada durante todo el período. En el EJEMPLO 2, doce individuos tomaron este complemento, que aumentó los niveles de nitrato y nitrito después de 1,5 horas en todos los individuos, y evitó una caída del pH por un enjuague con azúcar en comparación con un complemento de placebo. El complemento de placebo tenía una composición idéntica, salvo el extracto de remolacha, que se sustituyó por un peso idéntico de extracto de naranja (es decir, un vegetal con un contenido insignificante de nitrato, FIG. 8).

Este producto se suministra en una dosis única por día, preferentemente por la mañana, en forma de complemento alimenticio como polvo de extracto vegetal, y proporciona un efecto inmediato (en una hora, debido a la retención del nitrato en la cavidad bucal durante la deglución) y un efecto agudo pero indirecto (entre 1 y 6 horas) debido al reciclaje del nitrato, durante el cual disminuye una caída del pH después de la comida y, por lo tanto, se proporciona protección frente a las enfermedades bucales (tales como la caries dental).

Tabla 5: composición del complemento de remolacha

Ingrediente	mg/frasco de 92 g	mg/dosis (11,5 g)
Extracto de remolacha con 3 % de nitrato (Beta vulgaris)	66664,0	8333,00
Pectina de manzana E-440	23064,0	2883,00
Sabor natural a frutos rojos (Doler)	1600,0	200,00
Vitamina C, Ácido L-ascórbico	640,0	80,00
Sucralosa E-955 (riqueza 98-102 %)	32,0	4,00
Molibdato de amonio (heptamolibdato: 54,32 % de Mo)	0,73638	0,09205(= 50 µg de Mo)
Total	92000,7	11500,1

4.2. Aplicación de comprimidos masticables de dosis diaria (directo e indirecto)

Los comprimidos masticables (1 g) que contenían nitrato (222 mg si se trataba de 1 dosis, 111 mg si se trataba de 2 dosis, 74 mg si se trataba de 3 dosis) se consumieron diariamente por mascado y deglución después del desayuno e higiene bucal por la mañana y, si se dividieron en dos dosis, también después del almuerzo y, si se dividieron en tres dosis, también después de la cena e higiene bucal al final del día. Algunas variantes de los comprimidos de 1, 2 o 3 dosis contenían también 80 mg, 40 mg o 26,67 mg de vitamina C, respectivamente, y/o 50 µg, 25 µg o 16,67 µg de molibdeno. Por último, algunas variantes de los comprimidos contenían cantidades diarias aceptables de antioxidantes disponibles en el mercado, que se dividieron en 1, 2 o 3 dosis. Para elegir las combinaciones y cantidades óptimas de moléculas, se analizaron los diferentes comprimidos. Esto es ideal para un efecto agudo directo e indirecto sobre las enfermedades bucales, durante un período de 0-6 h después de la ingestión.

4.3. Aplicación de comprimidos masticables anticaries (directo e indirecto)

Los comprimidos (1 g) que contenían 74 mg de nitrato se consumieron por deglución antes de una comida. Se pudo consumir un máximo de tres comprimidos al día y se recomendó consumirlos 1 h antes de las tres comidas o tentempiés con más azúcar, preferentemente cada uno en una parte diferente del día (mañana, tarde y noche). Se añadieron otras moléculas basándose en el EJEMPLO 4.2. Esto es ideal para un efecto indirecto agudo sobre las enfermedades bucales, durante un período de 1-6 h después de la ingestión, así como para mejorar todos los estados de salud que están influenciados por un déficit de óxido nítrico.

4.4. Aplicación de gomas de mascar (directo e indirecto)

Las gomas de mascar (1 g) que contenían 37 mg de nitrato se consumieron por deglución antes de una comida. Se podía consumir un máximo de seis gomas de mascar por día y se recomendaba consumirlas justo

después de las comidas o los tentempiés, preferentemente al menos una en una parte diferente del día (mañana, tarde y noche). Se añadieron otras moléculas basándose en el EJEMPLO 4.2. Esto es ideal para un efecto indirecto agudo sobre las enfermedades bucales, durante un período de 1-6 h después de la ingestión, así como para mejorar todos los estados de salud que están influenciados por un déficit de óxido nítrico.

5 **4.5. Aplicación de pasta de dientes (directo)**

Una dosis de pasta de dientes de 0,3 g que contenía 74 mg de nitrato, 26,67 mg de vitamina C y 16,67 µg de molibdeno y otras moléculas basándose en el EJEMPLO 4.2, se usó por individuos como normalmente sin exceder las tres veces de cepillado de dientes al día. Se administra en el momento del cepillado, al igual que con una pasta de dientes convencional, por contacto con los dientes y la encía, lo que proporciona una aplicación tópica del nitrato directamente a las biopelículas bucales, quedando parte del nitrato también retenido en la cavidad bucal hasta que el aclaramiento de la saliva lo elimina. Se recomienda no lavarse la boca después de la aplicación.

4.6. Aplicación de colutorio (directo)

Se realiza un enjuague oral de 15 ml que contiene (111 mg de nitrato en el volumen total) durante 10 s mediante el cual se administra una aplicación tópica del producto de nitrato a la lengua, dientes, mucosa bucal y encías, y el nitrato se proporciona por lo tanto directamente a las biopelículas bucales, quedando parte del nitrato también retenido en la cavidad bucal hasta que el aclaramiento de la saliva lo elimina. Se recomienda no lavarse la boca después de la aplicación y no superar la IDA de 222 mg para un adulto de 60 kg (o 3,7 mg de nitrato por kg de peso corporal) usando el colutorio más de dos veces por día.

4.7. Gel bucal para la aplicación en las bolsas periodontales (directo)

Un gel bucoadhesivo es aplicado con una jeringa por un profesional dentro de las bolsas periodontales de los pacientes con una enfermedad periodontal, que contiene una concentración de 222 mg de nitrato para repartir en todas las bolsas periodontales, con o sin un probiótico de reducción de nitrato. En una preparación preferida, el gel también contiene molibdeno + vitamina C. Se aplica dentro de las bolsas en las visitas basales, de tratamiento y de seguimiento del paciente como tratamiento inicial. Se recomienda no comer ni beber durante una hora después de la aplicación. Puede combinarse un tratamiento de mantenimiento, en el que se proporciona un complemento o comprimido diarios de nitrato durante 1 a 4 semanas por la mañana. Cuando la composición comprende bacterias probióticas, el producto no se recomienda a pacientes inmunodeprimidos.

4.8. Aplicación de cápsulas o píldoras de dosis diaria (indirecto)

Las cápsulas (1 g) que contenían nitrato (222 mg si se trataba de 1 dosis, 111 mg si se trataba de 2 dosis, 74 mg si se trataba de 3 dosis) se consumieron diariamente por ingestión antes del desayuno e higiene bucal por la mañana y, si se dividieron en dos dosis, también antes del almuerzo y, si se dividieron en tres dosis, también antes de la cena e higiene bucal al final del día. Algunas variantes de las cápsulas de 1, 2 o 3 dosis contenían también 80 mg, 40 mg o 26,67 mg de vitamina C, respectivamente, y/o 50 µg, 25 µg o 16,67 µg de molibdeno. Por último, algunas variantes de las cápsulas contenían cantidades diarias aceptables de antioxidantes disponibles en el mercado, que se dividieron en 1, 2 o 3 dosis. Para elegir las combinaciones y cantidades óptimas de moléculas, se analizaron las diferentes cápsulas. Esto es ideal para un efecto agudo directo e indirecto sobre las enfermedades bucales, durante un período de 0-6 h después de la ingestión.

4.9. Aplicación de probióticos

Se proporciona un probiótico de reducción de nitrato en forma liofilizada con vitamina C y molibdeno, así como un agente espesante. Se mezcla con agua y se aplica en los dientes con una férula durante 5-30 minutos, para permitir la colonización bacteriana de la biopelícula dental. Se aplica por la noche al menos 30 minutos después de la higiene bucodental convencional, evitando comer o beber durante al menos una hora después de la aplicación. Esto es especialmente adecuado para tratar y prevenir enfermedades dentales (caries o enfermedades de las encías). En otro modo preferido de aplicación, la preparación probiótica se aplica en la lengua durante 1-5 minutos, lo que es especialmente adecuado para tratar la halitosis. Este producto no está recomendado a pacientes inmunodeprimidos.

4.10. Nutrición parenteral para aplicación intravenosa en unidades de cuidados intensivos (indirecto)

La nutrición parenteral (35 ml/kg de peso corporal/día) para aplicación intravenosa se administró a los pacientes de las unidades de cuidados intensivos (UCI), conteniendo los nutrientes diarios de los que depende el paciente, 222 mg de nitrato y 80 mg de vitamina C. Los pacientes de la UCI padecen inflamación, caries y halitosis y estas afecciones empeoran rápidamente cuando llegan a la UCI. La adición de nitrato a la nutrición parenteral limitó el desarrollo de una o más de estas afecciones.

4.11. Caramelos que contienen azúcar para niños y adultos

Se usaron diferentes tipos de caramelos, incluyendo ositos de goma u otros animales de goma (2-5 g por animal de goma) y otros caramelos a base de gelatina o pectina (2-25 g), piruletas pequeñas (4-25 g por piruleta), piruletas grandes (25-150 g por piruleta), barritas de chocolate y caramelo (20-70 g), goma de mascar o masticable (1-5 g), monedas de chocolate y otros chocolates (2-50 g), caramelos de regaliz (2-25 g), caramelos de mantequilla de cacahuete (2-25 g), caramelos de caramelo (2-25 g), caramelos duros y masticables con sabor a fruta (2-25 g), barritas de turrón (20-70 g), caramelos de melaza (4-25 g), caramelos de dulce de leche (4-25 g), palitos de caramelo (4-25 g), malvaviscos (2-20 g), caramelos en forma de corazón (2-20 g), y otros tipos de caramelos. Se añadieron diferentes cantidades de nitrato en forma de sales de nitrato o extractos vegetales a los caramelos mencionados para obtener cantidades finales de nitrato de 100 microgramos a 222 miligramos por caramelo. Las sales de nitrato y los extractos vegetales se combinaron a veces con vitamina C y/o antioxidantes disponibles en el mercado (como se describe en los EJEMPLOS 4.1-4.10). Para encontrar el equilibrio óptimo entre el azúcar y el nitrato para conseguir un efecto tamponador del pH que evite la acidificación de la saliva y de las biopelículas bucales cuando se consume azúcar (como se observa en los EJEMPLOS 1 y 2), cada caramelo se administró con diferentes cantidades de nitrato. En algunos casos, se añadieron fracciones de las dosis diarias recomendadas de molibdeno y cobre como cofactores a cada caramelo para mejorar el efecto tamponante del pH y los efectos antimicrobianos derivados de la reducción de nitrato.

4.12. Productos que contienen almidón y azúcar

Se añadió nitrato (de 100 microgramos a 222 miligramos por porción) y, en algunos casos, nitrato y cofactores (como se describe en el EJEMPLO 4.11) a otros productos que contienen almidón y azúcar para limitar su potencial cariogénico. Estos productos incluían pan, pasteles, galletas saladas, frutos secos, bebidas de frutas, zumo de frutas, helados, fideos, arroz, cereales edulcorados, bebidas energéticas edulcoradas, barritas de

proteínas, sopas precocinadas, barritas de cereales, fruta enlatada, yogur (bajo en grasas), salsa barbacoa, ketchup, salsa para pasta y otras salsas, refrescos edulcorados y otras bebidas edulcoradas, así como el propio azúcar añadido al té, al café y a otros productos.

4.13. Alimentos y tentempiés para mascotas y ganado

5 Otras realizaciones que contienen aportes complementarios de nitrato se usaron para mejorar la salud bucodental (p. ej., para tratar la halitosis, las enfermedades de las encías, el sarro o la caries dental), o como estrategia de prevención de las enfermedades bucales y las enfermedades sistémicas relacionadas con el óxido nítrico en mamíferos distintos de los seres humanos, incluyendo gatos, perros, caballos, vacas, cerdos, cabras, ovejas, burros, búfalos, bueyes, llamas y camellos. El nitrato (con una dosis recomendada de 1,43 microgramos a 10 3,3 miligramos por kg de peso del animal) y, en algunos casos, el nitrato y los cofactores se añadieron a diferentes productos aptos para consumo animal. Para perros y gatos, se trataba de alimentos secos y húmedos, chicles, galletas, palitos dentales, golosinas húmedas y otras golosinas. Para caballos, vacas, cerdos, cabras, ovejas, burros, búfalos, bueyes, llamas y camellos, se trataba de alimentos secos, bloques de sal, pepitas de fruta, galletitas y otras golosinas. El nitrato se añadió en forma de sales de nitrato o extractos vegetales a los productos 15 mencionados anteriormente para obtener cantidades finales de nitrato de 100 microgramos a 222 miligramos por ración de alimento o golosina.

4.14. Bajas dosis diarias de nitrato en productos para la salud bucodental

Todos los productos con aplicaciones tópicas descritos de los EJEMPLOS 4.1-4.12 se produjeron con dosis bajas de nitrato, de modo que la cantidad total de nitrato aplicada o ingerida tras usar un producto una o 20 varias veces al día se mantuvo muy por debajo de la IDA (p. ej., de 100 microgramos a 74 miligramos de nitrato al día), pero fue lo suficientemente alta como para proporcionar efectos beneficiosos para la salud bucodental. Los efectos bucales beneficiosos comenzaron a partir de la primera dosis. Sin embargo, se aplicó un plan de tratamiento consistente en una dosis diaria durante una semana o varias semanas o meses para conseguir un efecto acumulativo en la mejora de la capacidad de reducción de nitrato, un aumento de las bacterias de reducción 25 de nitrato asociadas a la salud (p. ej., *Rothia spp.* y *Neisseria spp.*) y una disminución de las bacterias asociadas a una enfermedad (p. ej., *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivaiis*) en las biopelículas bucales.

4.15. Aplicación de pasta lingual (directo)

Dosis de pasta lingual de 0,3, 0,5 o 1 g, que contenían 111 mg de nitrato y, en algunos casos, 40 mg de vitamina C, 25 µg de molibdeno, 0,5 mg de cobre y/u otras moléculas basándose en el EJEMPLO 4.2 fueron usadas 30 por individuos a los que se les indicó que se cepillaran la lengua dos veces al día con un cepillo de dientes o un cepillo de lengua durante 3 minutos. Para aumentar los efectos bucales beneficiosos y los niveles sistémicos de óxido nítrico, se recomienda no lavarse la boca después de la aplicación.

4.16. Hilo dental con nitrato (directo)

El hilo dental recubierto con 111 mg de nitrato por 50 cm y, en algunos casos, con 40 mg de vitamina C 35 por 50 cm, 25 µg de molibdeno por 50 cm, 0,5 mg de cobre por 50 cm y/u otras moléculas basándose en el EJEMPLO 4.2 fue usado por individuos a los que se les indicó que se pasaran el hilo dental como normalmente, sin exceder las dos veces recomendadas de limpieza con hilo dental por día.

EJEMPLO 5: Determinación de la capacidad de reducción de nitrato (CRN)

Un dentista experimentado evaluó la salud bucodental de 20 participantes. No se detectaron caries activas ni antecedentes de periodontitis y todos los participantes fueron considerados bucalmente sanos. De manera adicional, no se informó de ninguna enfermedad sistémica y no se detectó hipertensión entre los participantes. Se pidió a los donantes que se abstuvieran de higiene bucal y desayuno (solo se permitió el consumo de agua) por la mañana y donaron ~4 ml de saliva alrededor de las 9 a.m. Se prepararon dos tubos Eppendorf de saliva con nitrato 8 mM (450 µl de saliva con 50 µl de nitrato 80 mM estéril de solución en agua). Uno se congeló directamente a -20 °C y el otro se incubó durante 2 horas a 37 °C. El nitrato se midió como se describe en el EJEMPLO 1 y se compararon los dos puntos de tiempo para determinar cuántos mg/l se habían reducido.

En promedio se redujeron 112,20 mg/l (DT 87,43 mg/l) de nitrato (media: 91 mg/l). El nitrato reducido después de 2 h (NO₃R2h) en los diferentes participantes se dividió en percentiles de un tercio (33,33 %) y dos tercios (66,67 %), que fueron 56 mg/l y 176 mg/l, respectivamente (Tabla 6). Cuando se representa como porcentaje del nitrato inicial detectado, éste fue del 15 % y del 35 %, respectivamente (tabla 6). Después, los sujetos se dividieron en malos reductores de nitrato (por debajo de 57 mg/l), reductores intermedios de nitrato (entre 57-175 mg/l, inclusive) y buenos reductores de nitrato (por encima de 175 mg/l), con 8, 6 y 6 participantes en cada grupo, respectivamente.

Tabla 6. NRC1: división en tercios

BASADO EN TERCIOS	NO ₃ R2h (mg)	NO ₃ R2h (%)	Clasificación	N (20)
Por debajo de 1/3	<57	<15 %	Mala	8
Entre 1/3 y 2/3 inclusive	57-175	15-35 %	Intermedia	6
Por encima de 1/3	>175	>35 %	Buena	6

EJEMPLO 6: Estudio *ex vivo* - efectos del nitrato en el crecimiento de una biopelícula bucal de pacientes humanos con periodontitis

Además de las biopelículas bucales de individuos sanos proporcionadas en el EJEMPLO 1, se realizaron experimentos *ex vivo* con una comunidad disbiótica (muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis). Se incluyeron en el estudio once pacientes diagnosticados con periodontitis. La placa subgingival se recogió insertando de ocho a diez puntas de papel estériles dentro de las bolsas periodontales más profundas. Las puntas de papel se transfirieron luego a un tubo de 2 ml que contenía un medio de transporte reducido (RTF) y se almacenaron en una caja de enfriamiento a aproximadamente 4 °C durante un máximo de 18 horas. Para el crecimiento de la biopelícula, se usó ICC que contenía vitamina K y hemina (como se describe en el EJEMPLO 1). El medio de transporte se eliminó por centrifugación (1 min, 12000 rpm), seguido de la resuspensión en 1 ml de ICC. Se usó el sistema xCELLigence descrito en el EJEMPLO 1. Las muestras de los pacientes se incubaron en cuatro condiciones diferentes; control, nitrato, control+probiótico y nitrato+probiótico. En primer lugar, se añadieron a los pocillos 100 µl de placa periodontal en ICC. Después, para la condición de nitrato, se añadieron 5 µl de nitrato 250 mM en ICC a los pocillos para obtener una concentración de nitrato 5 mM. Para las condiciones de control+probiótico y nitrato+probiótico, se añadieron 45 µl de cultivo de *R. aeria* D1P7 de DO (600 nm) = 0,417 a

los pocillos, lo que dio como resultado una DO final (600 nm) de 0,075 por pocillo. Se añadió ICC hasta alcanzar un volumen final de 250 µl. Se usó un control del medio (sin muestra del paciente ni probiótico) con nitrato (Ctrl) para determinar las cantidades iniciales de nitrato y nitrito en el medio. Después de 7 horas de incubación, se cosechó el sobrenadante y la biopelícula para las mediciones de nitrato/nitrito y la secuenciación del gen ARNr 16S, respectivamente (ambos descritos en el EJEMPLO 1).

En este experimento, la adición de nitrato 6,5 mM a la muestra mejoró la composición de la biopelícula, reduciendo los niveles de patógenos periodontales tales como *Porphyromonas*, *Eikenella* y *Tannerella*, entre otros (FIG. 13A). Sin embargo, cuando se aplicó un tratamiento simbiótico (es decir, nitrato como prebiótico junto con *Rothia aeria* D1P7 como probiótico), se consiguió una mejora muy eficaz de la composición bacteriana, con un aumento significativo de *Rothia* (especie beneficiosa) y una disminución significativa de los patógenos periodontales, incluyendo *Fusobacterium*, *Fretibacterium* y *Treponema* (FIG. 13B), lo que demuestra que se invirtió la disbiosis. Por tanto, se redujeron más patógenos periodontales con el tratamiento simbiótico, y esa reducción fue mayor, en comparación con el resultado cuando solo se añadió nitrato. Esta mejora adicional se debe a los bajos niveles de bacterias de reducción de nitrato en comunidades bacterianas altamente disbióticas como las de las bolsas periodontales, lo que hace que la adición de un probiótico sea muy eficaz. Los mismos resultados se obtuvieron al analizar las muestras a nivel taxonómico de especies, con mayores reducciones de patógenos periodontales en el tratamiento simbiótico en comparación con el tratamiento de solo nitrato (FIG. 13C y 13D). De este experimento se concluye que los resultados de los cultivos puros no pueden prever el efecto del nitrato o de las bacterias de reducción de nitrato en las biopelículas bucales complejas. En su lugar, es necesario analizar los efectos en muestras biológicas reales, es decir, biopelículas bucales bacterianas disbióticas. El mismo beneficio superior del tratamiento con nitrato+probiótico en comparación con el nitrato solo se observó también al analizar la capacidad de reducción de nitrato. En el tratamiento con nitrato, alrededor del 20 % del nitrato se redujo después de las 7 horas de crecimiento en estas muestras periodontales. Cuando se aplicó el nitrato junto con el probiótico *Rothia aeria* D1P7, se redujo el 90 % del nitrato, lo que indica que, aunque ambos tratamientos permitieron la reducción del nitrato, el tratamiento simbiótico fue superior (FIG. 14A). Al medir el nitrito producido, el tratamiento de nitrato+probiótico triplicó los valores obtenidos al añadir solo nitrato (FIG. 14B). Por tanto, la adición de nitrato mejoró la disbiosis y la capacidad de reducir el nitrato, mientras que la adición de nitrato más uno de los probióticos descritos en la presente solicitud revirtió aún más la disbiosis y restauró la capacidad de reducción de nitrato en los pacientes graves.

Asimismo, la curva media de crecimiento de las biopelículas de periodontitis en las condiciones de nitrato (N) fue menor que en la condición de control (C). Esto se muestra en la FIG. 14C-F, que muestra las curvas medias de crecimiento de los 11 pacientes (FIG. 14C) y diferentes tipos de curvas de tres pacientes individuales (FIG. 14D-F). Esto demuestra que el nitrato tiene un efecto de acumulación antibiopelículas (o un efecto antiplaca) en las biopelículas disbióticas. En conclusión, en este Ejemplo, se demuestra que el nitrato reduce la disbiosis pero también reduce la cantidad de biopelícula (es decir, la placa dental).

EJEMPLO 7: Identificación de las bacterias de las muestras humanas recogidas en el EJEMPLO 2 (Estudio *in vivo* - administración oral de nitrato a individuos humanos sanos)

Las muestras bucales recogidas en el EJEMPLO 2 se usaron para determinar la composición bacteriana mediante la secuenciación del gen ARNr 16S de Illumina (métodos descritos en el EJEMPLO 1, puntos 6.1-6.3). Los datos muestran que cuatro horas después de ingerir un complemento de nitrato de 220 mg, los sujetos humanos muestran un aumento de las bacterias de reducción de nitrato *Rothia* y *Neisseria* y una disminución de varios patógenos de la caries, incluyendo *Veillonella*, *Atopohium* u *Oribacterium*, y una disminución de los patógenos periodontales y de la halitosis (FIG. 15A), incluyendo *Dialister*, *Fretibacterium*, *Saccharimonas*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Alloprevotella*, *Selenomonas*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*. Los resultados a nivel de especie confirman los resultados, con la disminución de muchas especies asociadas a la caries, asociadas a la periodontitis y asociadas a la halitosis (FIG. 15B). Esto confirma que una única dosis de nitrato ingerido reduce los patógenos bucales de la periodontitis y la halitosis *in vivo*. Asimismo, muestra que los resultados en el modelo complejo de biopelícula multiespecie usado en los EJEMPLOS 1 y 6 se confirman con los datos *in vivo* en el EJEMPLO 2 y 7. Esto pone de manifiesto la importancia de usar un modelo de biopelícula robusto y representativo para replicar las condiciones reales de la cavidad bucal, a diferencia de los cultivos puros de una sola especie, cuyos resultados no pueden extrapolarse a comunidades microbianas bucales complejas.

EJEMPLO 8: Caracterización de las especies de reducción de nitrato identificadas en el EJEMPLO 3

Se realizó otro cálculo más sencillo del nitrito y el óxido nítrico producido en el EJEMPLO 3, considerando el 100 % de nitrito como el nivel máximo de nitrito presente en todas las muestras. Los resultados muestran los niveles estimados de nitrito y óxido nítrico para los diferentes aislados, así como sus posibles aplicaciones (Tabla 7). Notablemente, todos los probióticos reducen el nitrato y producen nitrito y productos de reducción de nitrato (p. ej., óxido nítrico y/o amoníaco). Por lo tanto, todos los probióticos son adecuados para tratar las diferentes afecciones (es decir, caries, enfermedades periodontales, halitosis, afecciones cardiovasculares y otras afecciones sistémicas), pero algunas cepas pueden ser más eficaces para tratar una afección que otras.

Tabla 7. Nitrito y óxido nítrico producidos por los aislados crecidos a pH diferente durante 5 h con nitrato 6,5 mM. Los cálculos se basan en que la concentración máxima de nitrito detectada sea del 100 %.

Aislado	Especie (16S)	Nitrato reducido (NO3R) en:	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	Ejemplos de aplicación*3
D1P7 (CECT9999*1)	<i>Rothia aeria</i>	NO3R total (%)	52*	100	100*	Enfermedades periodontales (perio.*4/salud bucodental general)
		% de nitrito	20	77*	85*	
		% de óxido nítrico*2	32	23*	15*	
D1P10	<i>Rothia dentocariosa</i>	NO3R total (%)	48	47	23	Caries
		% de nitrito	15	27	23	
		% de óxido nítrico*2	33*	20*	0,3	
D1P15A	<i>Rothia dentocariosa</i>	NO3R total (%)	50	53	43	Salud bucodental general
		% de nitrito	17	36	27	
		% de óxido nítrico*2	33*	16	17*	
D1P17 (CECT30000)	<i>Rothia dentocariosa</i>	NO3R total (%)	48	49	49	Aplicaciones sistémicas
		% de nitrito	21*	37	37*	
		% de óxido nítrico*2	27	13	12	
D3T4 (CECT30001)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	34	61*	69*	Perio. /aplicaciones sistémicas
		% de nitrito	14	43*	55*	
		% de óxido nítrico*2	20	18*	14*	

Aislado	Especie (16S)	Nitrato reducido (NO3R) en:	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	Ejemplos de aplicación* ³
D4P7	<i>Rothia dentocariosa</i>	NO3R total (%)	53*	46	48	Salud bucodental general
		% de nitrito	16	34	28	
		% de óxido nítrico* ²	38*	12	20*	
D4T4 (CECT30002)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	52*	55	52*	Aplicaciones sistémicas
		% de nitrito	21*	48*	40*	
		% de óxido nítrico* ²	31	7	12	
D4T6 (CECT30003)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	77*	66*	35	Caries
		% de nitrito	41*	40*	35	
		% de óxido nítrico* ²	35*	26*	0	
D4T9 (CECT30004)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	59*	67*	57*	Salud bucodental general
		% de nitrito	24*	36	32	
		% de óxido nítrico* ²	35*	30*	25*	
D5T11A (CECT30005)	<i>Rothia mucilaginosa</i>	NO3R total (%)	48	55	78*	Aplicaciones sistémicas
		% de nitrito	20*	42*	65*	
		% de óxido nítrico* ²	28	13	13	
Medias	-	NO3R total (%)	51	55	51	-
	-	% de nitrito	20	38	36	-
	-	% de óxido nítrico* ²	33	17	13	-

*número por encima de la media

*¹ registrado en la colección de cultivos e incluido en esta patente

*² óxido nítrico y otros compuestos que pueden resultar de la reducción de nitrito (p. ej., amonio)

*³ obsérvese que todos los probióticos podrían usarse para mejorar todas las afecciones mencionadas, ya que la
5 reducción de nitrito estimula la salud bucodental y sistemática generales.

*⁴ debido a la degradación de las proteínas, la halitosis también se produce a un pH neutro a alcalino y se pueden
aplicar los mismos probióticos propuestos para las enfermedades periodontales.

LISTADO DE REFERENCIAS

- 10 Pérez-Chapparo *et al.*, 2014 ("Newly Identified Pathogens Associated with Periodontitis"; J Dental Res 2014; 93(9): 846-858)
- Koopman *et al.*, 2016 ("Nitrate and the Origin of Saliva Influence Composition and Short Chain Fatty Acid Production of Oral Microcosms"; Microb Ecol 2016; 72:479-492)
- Velmurugan *et al.*, 2016 ("Dietary nitrate improves vascular function in patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study"; Am J Clin Nutr 2016; 103:25-38)
- 15 Vanhatalo *et al.*, 2018 ("Nitrate-responsive oral microbiome modulates nitric oxide homeostasis and blood pressure in humans"; Free Radic Biol Med. 20 de agosto de 2018; 124: 21-30)
- Kuang *et al.*, 2018 ("Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms"; Biomed Res 2018; 2018:6498932)
- 20 Mira 2018 ("Oral Microbiome studies: Potential diagnostic and therapeutic implications"; Advances Dent Res 2018; 29(1):71-77)
- Simón-Soro *et al.*, 2013 ("A tissue-dependent hypothesis of dental caries"; Caries Research 2013;

47(6):591-600)

Jockel-Schneider *et al.*, 2016 ("Stimulation of the nitrate-nitrite-NO-metabolism by repeated lettuce juice consumption decreases gingival inflammation in periodontal recall patients: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial"; J Clin Periodontol 2016; 43: 603-608)

5 Li *et al.*, 2007 ("Salivary nitrate - an ecological factor in reducing oral acidity"; Oral Microbiol Immunol 2007; 22(1):67-71)

Rosier *et al.*, 2018 ("Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis"; Journal of Dental Research 2018; April;97(4):371-380)

10 Burtleigh *et al.*, 2019 ("Dietary nitrate supplementation alters the oral microbiome but does not improve the vascular responses to an acute nitrate dose"; Nitric Oxide 89 2019; 54-63)

Takahashi *et al.*, 2005 ("Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases"; International Congress Series 2005; 1284; 103-112)

DeGruttola *et al.*, 2016 ("Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models"; Inflamm Bowel Dis 2016; 22(5); 1137-1150)

15 Iebba *et al.*, 2016 ("Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota"; New Microbiol 2016; Enero; 39(1): 1-12)

Navazesh y Christensen, 1982 ("A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures"; J Dent Res 1982; 61; 1158-1162)

20 Mira *et al.*, 2019 ("Development of an *in vitro* system to study oral biofilms in real time through impedance technology: validation and potential applications"; J Oral Microbiol 2019; 11(1): 1609838)

Ferrer *et al.*, 2017 ("Effect of antibiotics on biofilm inhibition and induction measured by real-time cell analysis"; J Appl Microbiol marzo de 2017; 122(3):640-650)

Dzidic *et al.*, 2019 ("Oral microbiota maturation during the first 7 years of life in relation to allergy development"; Allergy octubre de 2018; 73(10); 2000-2011.

25 Boix-Amorós *et al.*, 2016 ("Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Mac-ro nutrients, and Human Cells during Lactation"; Front Microbiol 20 de abril de 2016; 7(492); eCollection 2016)

Edgar *et al.*, 2011 ("UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection"; Bioinformatics 2011; 27(16); 2194-200)

30 Wang *et al.*, 2007 ("Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy"; Appl Environ Microbiol 2007; 73(16); 5261-7)

Rognes *et al.*, 2016 ("VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics"; PeerJ 2016; 4; e2584)

Oksanen *et al.*, 2007 ("H. vegan: Community Ecology Package, R package version 2.4-2"; <http://CRAN.R-project.org/package=vegan> 2017)

35 Koopman *et al.*, 2016 ("Changes in the oral ecosystem induced by the use of 8 % arginine toothpaste"; Arch Oral Biol 2016; 73; 79-87)

Doel *et al.*, 2005 ("Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity"; European journal of oral sciences 2005; 113(1); 14-19)

Mashimo *et al.*, 2015 ("Variations of Nitrate-reducing Activity in Oral *Rothia mucilaginosa*"; Journal of Oral Tissue Engineering 2015; 13(1); 18-26)

Lundberg *et al.*, 2018 ("Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease"; Cell Metab 3 de julio de 2018; 28(1); 9-22)

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición oral que comprende nitrato para su uso en un tratamiento agudo o la prevención de la disbiosis bucal en un mamífero,
5 donde el tratamiento agudo o la prevención de la disbiosis oral comprende cambiar la composición bacteriana y las funciones de las biopelículas orales en un mamífero, y disminuir la cantidad de bacterias asociadas a enfermedades y aumentar la cantidad de bacterias asociadas a la salud;
donde la composición se administra por vía oral al mamífero y, de este modo, aumenta la concentración de nitrato en la saliva de la boca;
10 donde la cantidad de nitrato por dosis de composición es al menos 3 microgramos cuando la composición oral es una composición aplicada tópicamente, y al menos 12 microgramos cuando la composición oral es una composición ingerida; y
donde el tratamiento agudo o prevención tiene efectos antes de 24 horas de una enfermedad bucal mediada por biopelículas.
15
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el nitrato administrado:
aumenta la cantidad de al menos una bacteria asociada a la salud de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Neisseria*, *Rothia* y *Kingella* en las biopelículas bucales, y/o
disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a la caries de las biopelículas bucales seleccionada del
20 grupo que consiste en *Streptococcus*, *Veillonella*, *Oribacterium* y *Atopobium* en las biopelículas bucales, y/o
disminuye la cantidad de al menos una bacteria asociada a enfermedades periodontales/halitosis de las biopelículas bucales seleccionada del grupo que consiste en *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella*, *Alloprevotella*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, y *Solobacterium* en las biopelículas bucales.
25
3. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la enfermedad bucal mediada por biopelículas se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad periodontal, halitosis y caries.
- 30 4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
donde la composición es una composición aplicada tópicamente seleccionada del grupo que consiste en:
- una pasta de dientes;
- un colutorio;
- un gel bucal;
35 - hilo dental;
- una pasta para la lengua;
- un extracto alimenticio;

- una goma de mascar;
- un comprimido masticable; y
- un polvo de complemento; o

donde la composición es una composición ingerida seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 - comprimidos, píldoras o cápsulas;
- un extracto alimenticio;
- una goma de mascar;
- un comprimido masticable;
- un alimento o snack para mascotas y ganado;
- 10 - productos que contienen almidón y azúcar;
- un polvo de complemento; y
- nutrición parenteral para aplicación intravenosa.

5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde la composición es un complemento alimenticio que comprende un extracto vegetal rico en nitratos o nitrato en forma de sal, un antioxidante y/o un cofactor de la enzima nitrato reductasa.

6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el cofactor de la enzima nitrato reductasa es molibdeno o cobre.

7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, donde el extracto vegetal rico en nitratos es un extracto de remolacha.

8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde la composición es un complemento alimenticio que comprende un extracto vegetal rico en nitrato que es un extracto de remolacha, un antioxidante y/o un cofactor de la enzima nitrato reductasa que es molibdeno, una sal del mismo o un extracto vegetal rico en molibdeno.

9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la concentración salival de nitrato en la boca después de la administración de la composición por encima de los niveles salivales en ayunas es:

al menos 0,1 mM 30 s después de la administración cuando la composición es una composición aplicada tópicamente y,

al menos 0,1 mM al menos 1,5 h después de la administración cuando la composición es una composición ingerida.

10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, administrada en combinación con al menos una cepa bacteriana perteneciente al género *Rothia*, donde la cepa bacteriana *Rothia*:

- a) reduce el 100 % de nitrato tras 7 h de incubación a 37 °C partiendo de una densidad óptica (DO) de 0,01 en medio ICC con nitrato 6,5 mM;
 - b) reduce más del 15 % de nitrato tras 4 h de incubación a 37 °C partiendo de una DO de 0,01 en medio ICC con nitrato 6,5 mM;
 - 5 c) no disminuye el pH del medio ICC con nitrato 6,5 mM tras 7 h de incubación a 37 °C partiendo de una DO de 0,01 por debajo de un pH 6,8;
 - d) crece hasta alcanzar una densidad óptica superior a 0,7 tras 7 h de crecimiento en medio ICC con nitrato 6,5 mM a 37 °C partiendo de una DO de 0,01; y
 - e) es capaz de colonizar una biopelícula bucal *in vitro* crecida a partir de saliva humana durante 5 h a 37 °C cuando
 - 10 se añade 1:1 de cepa bacteriana de *Rothia* en ICC (DO 0,40):inóculo de saliva, alcanzando una proporción superior al 10 % de las bacterias totales en la biopelícula formada.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde la cepa bacteriana se selecciona del grupo que consiste en las cepas depositadas ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con los
- 15 números de acceso CECT 9999, CECT 30000, CECT 30001, CECT 30002, CECT 30003, CECT 30004, y CECT 30005.

FIG. 1

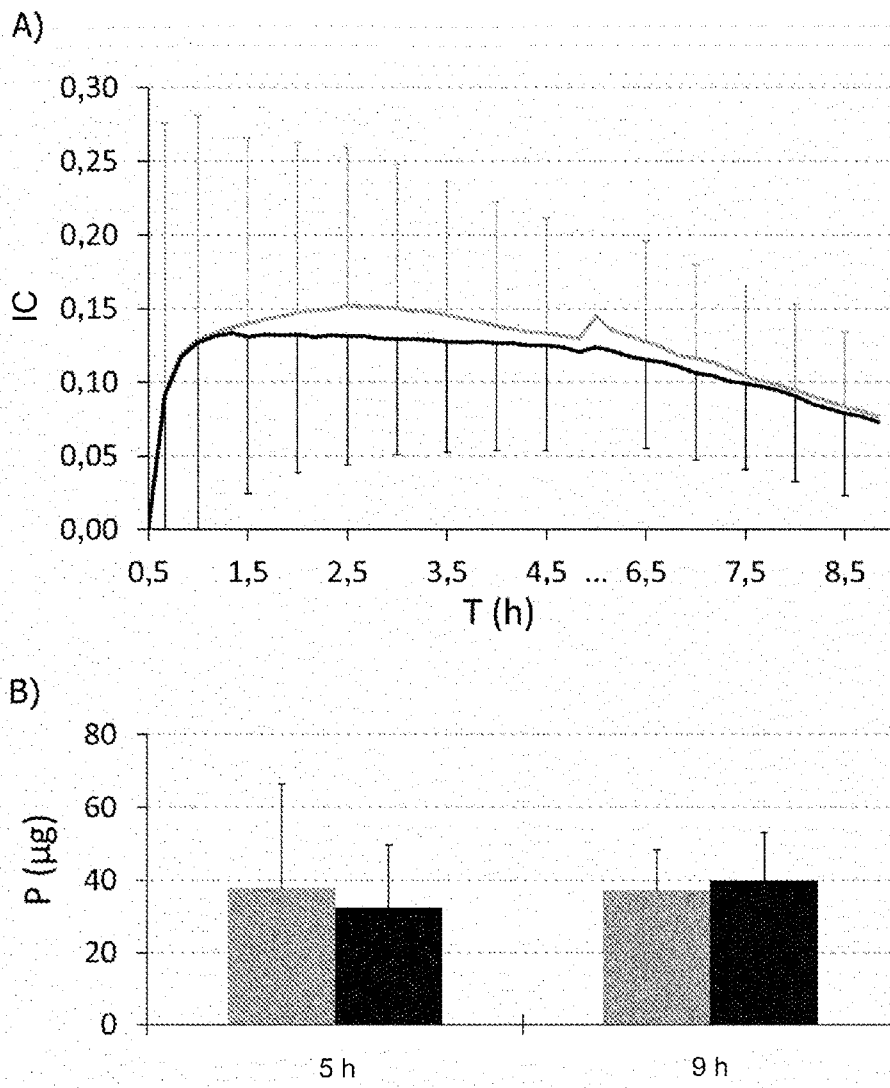


FIG. 2

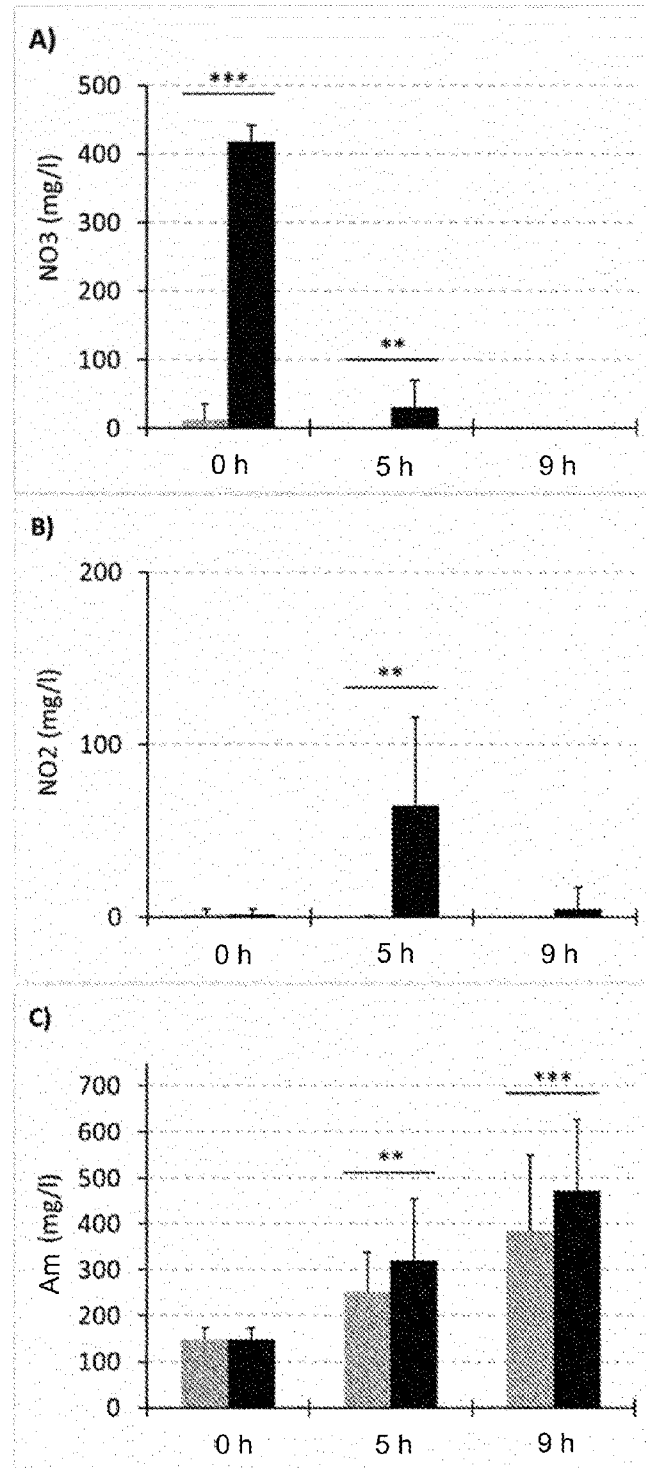


FIG. 2 (cont.)

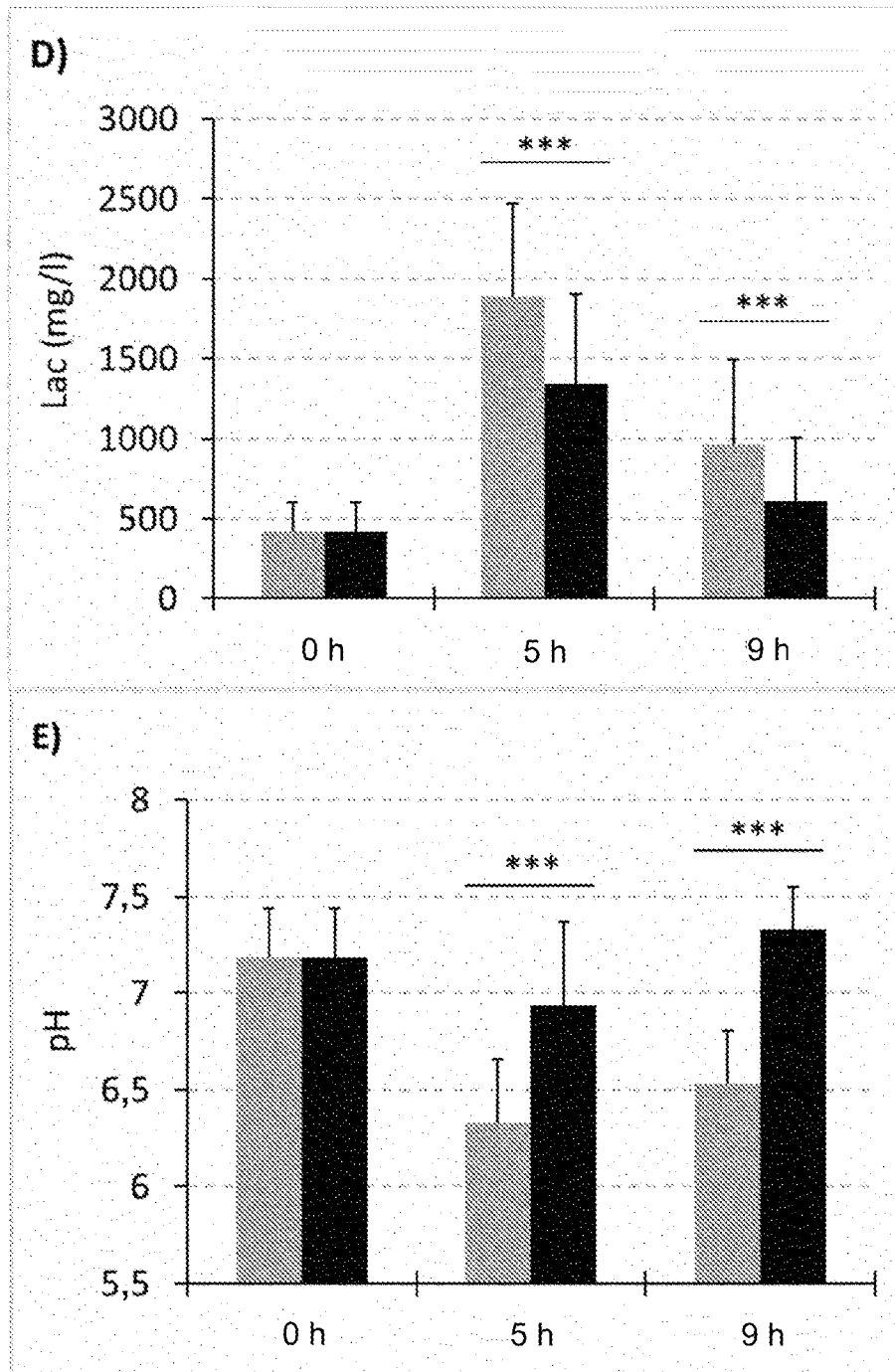


FIG. 3

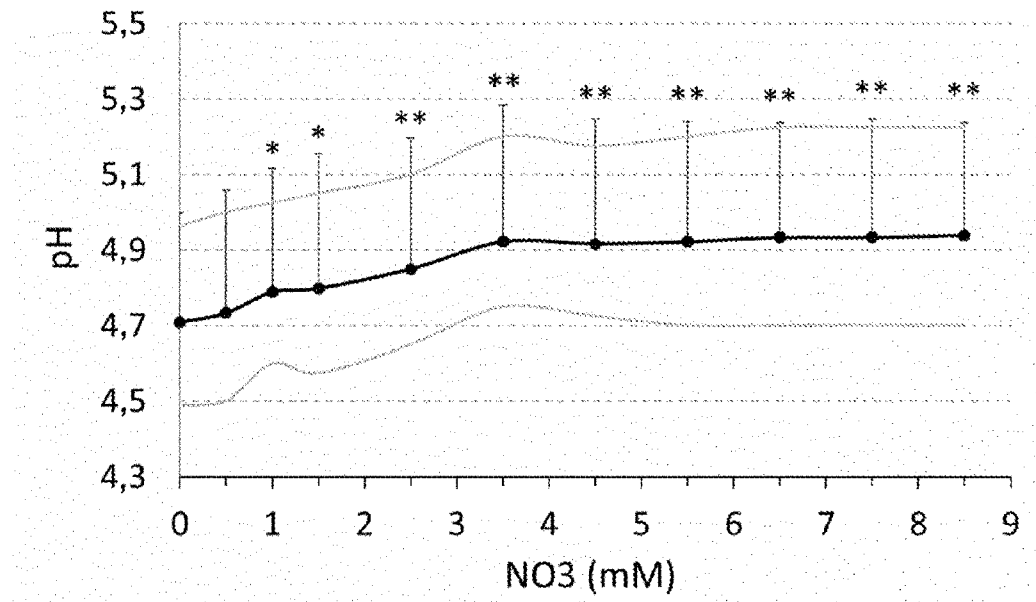


FIG. 4

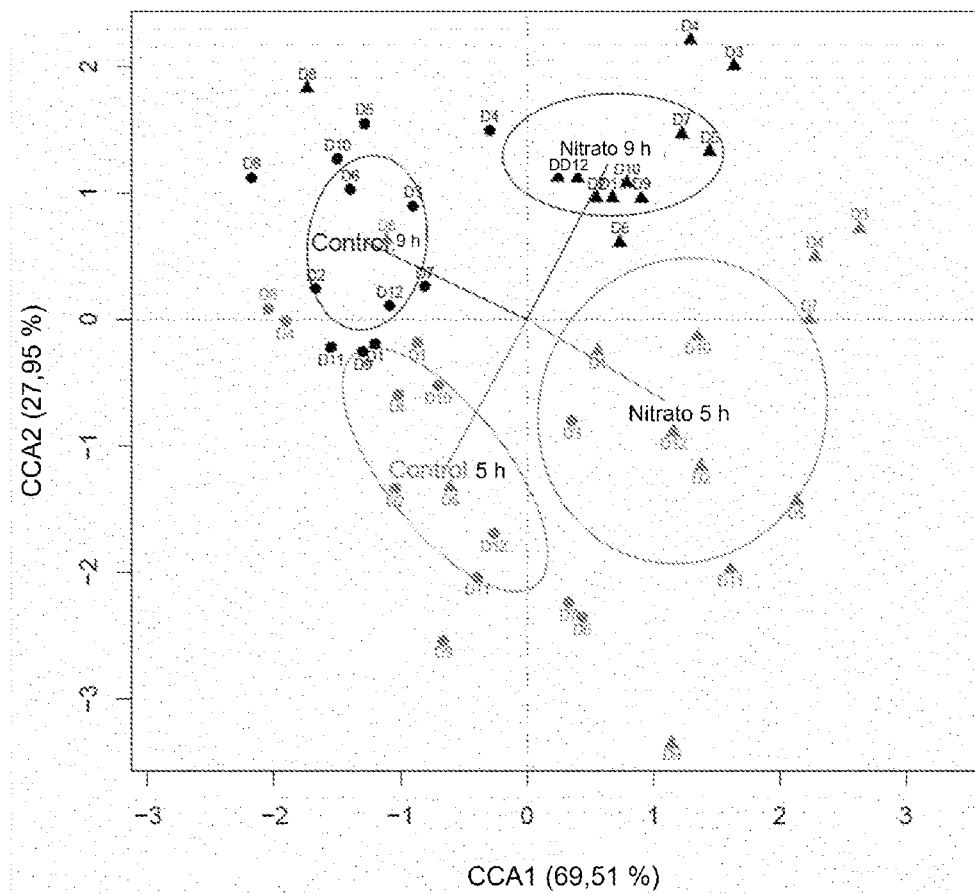


FIG. 5

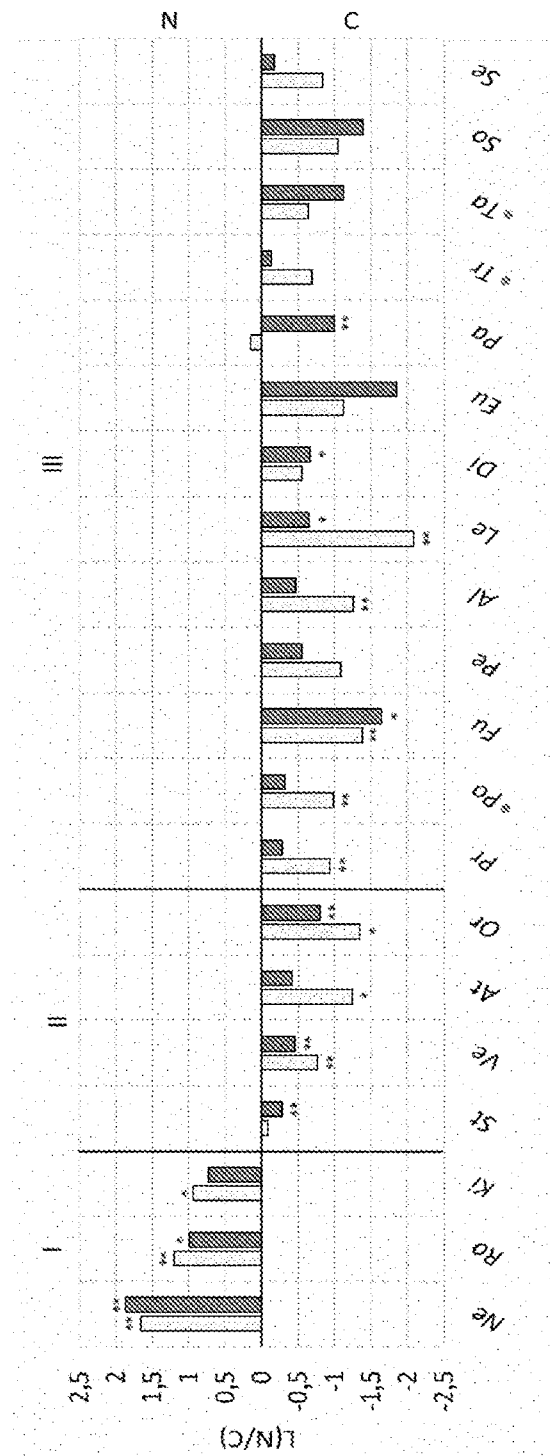


FIG. 6

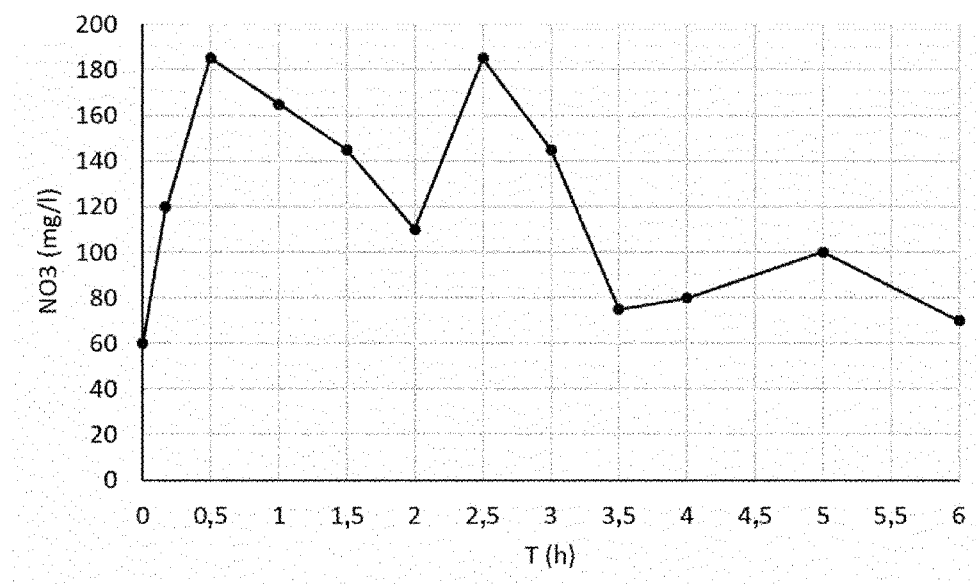


FIG. 7

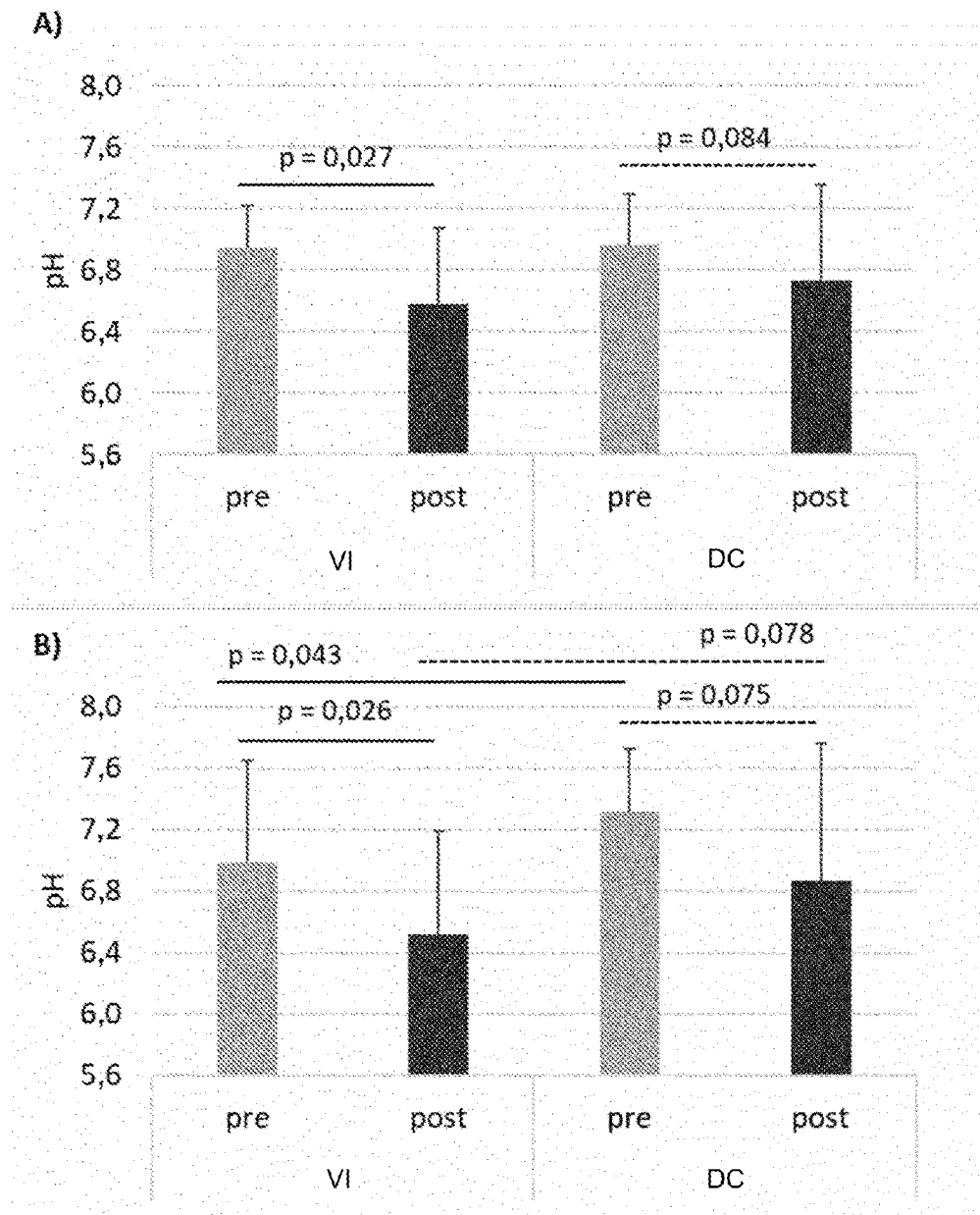


FIG. 8

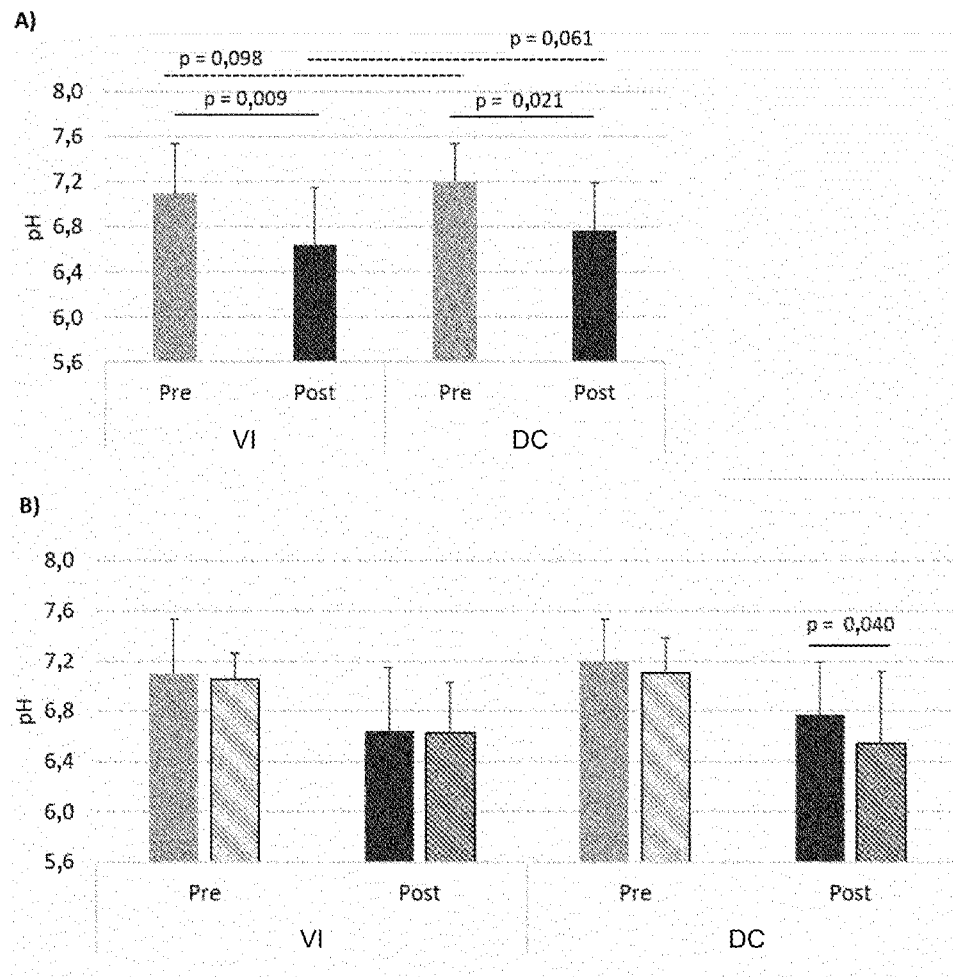


FIG. 9

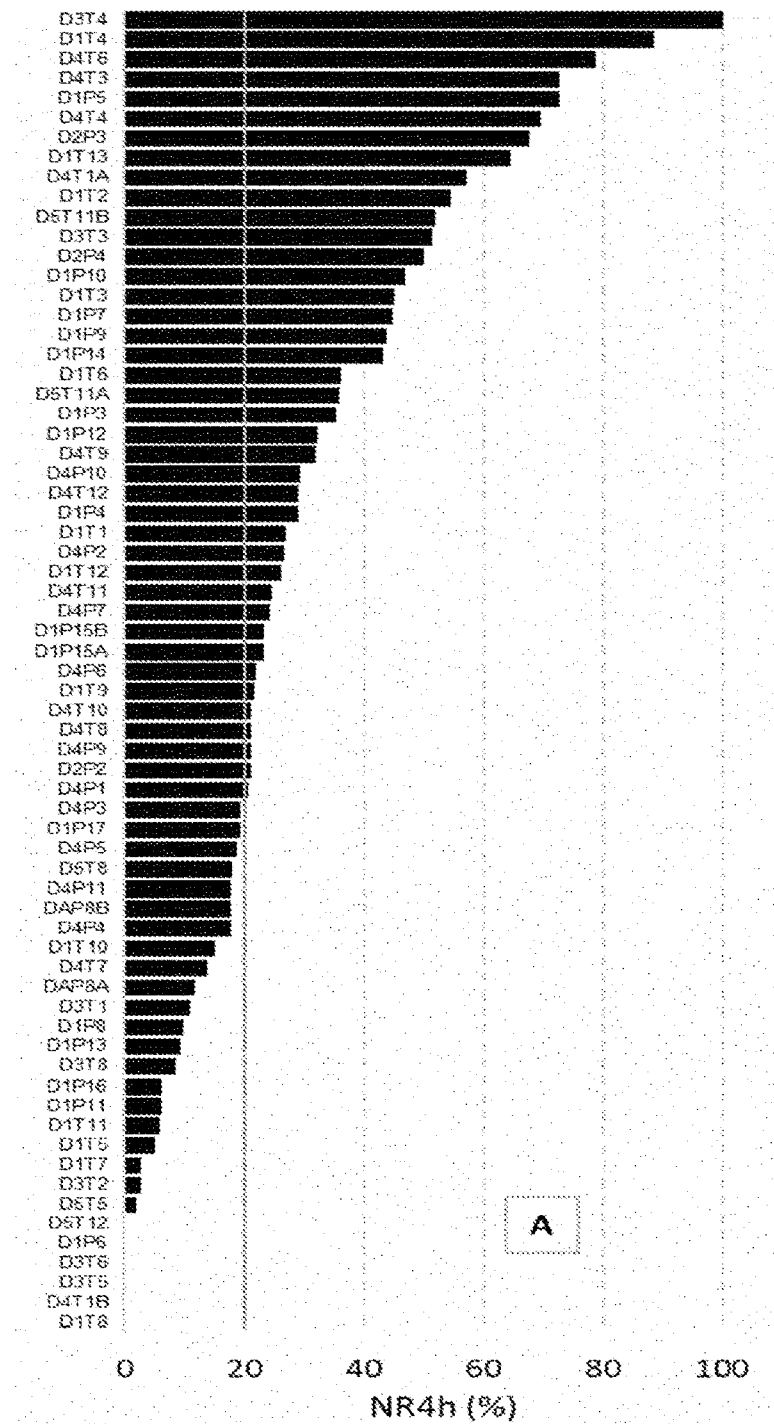


FIG. 9 (cont.)

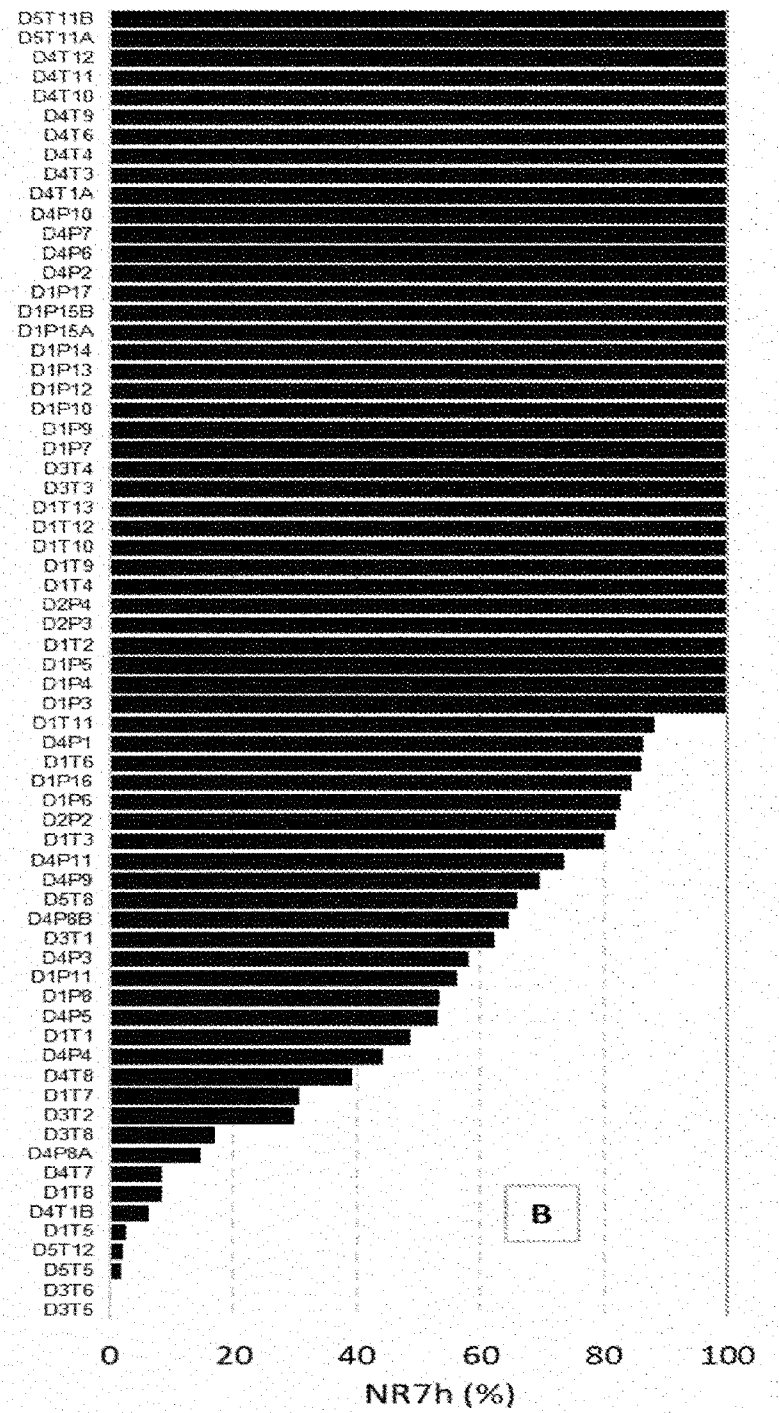


FIG. 10

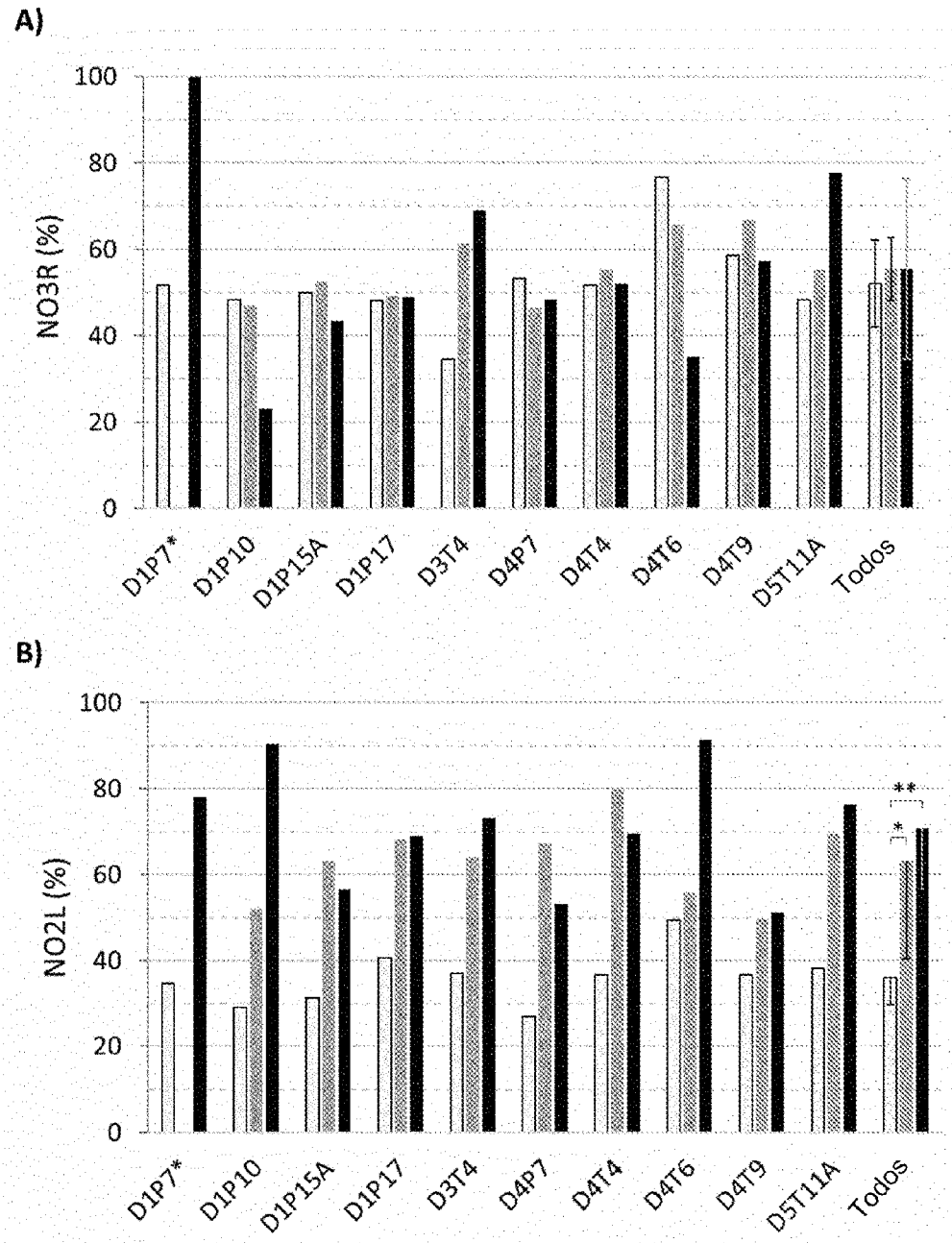


FIG. 11

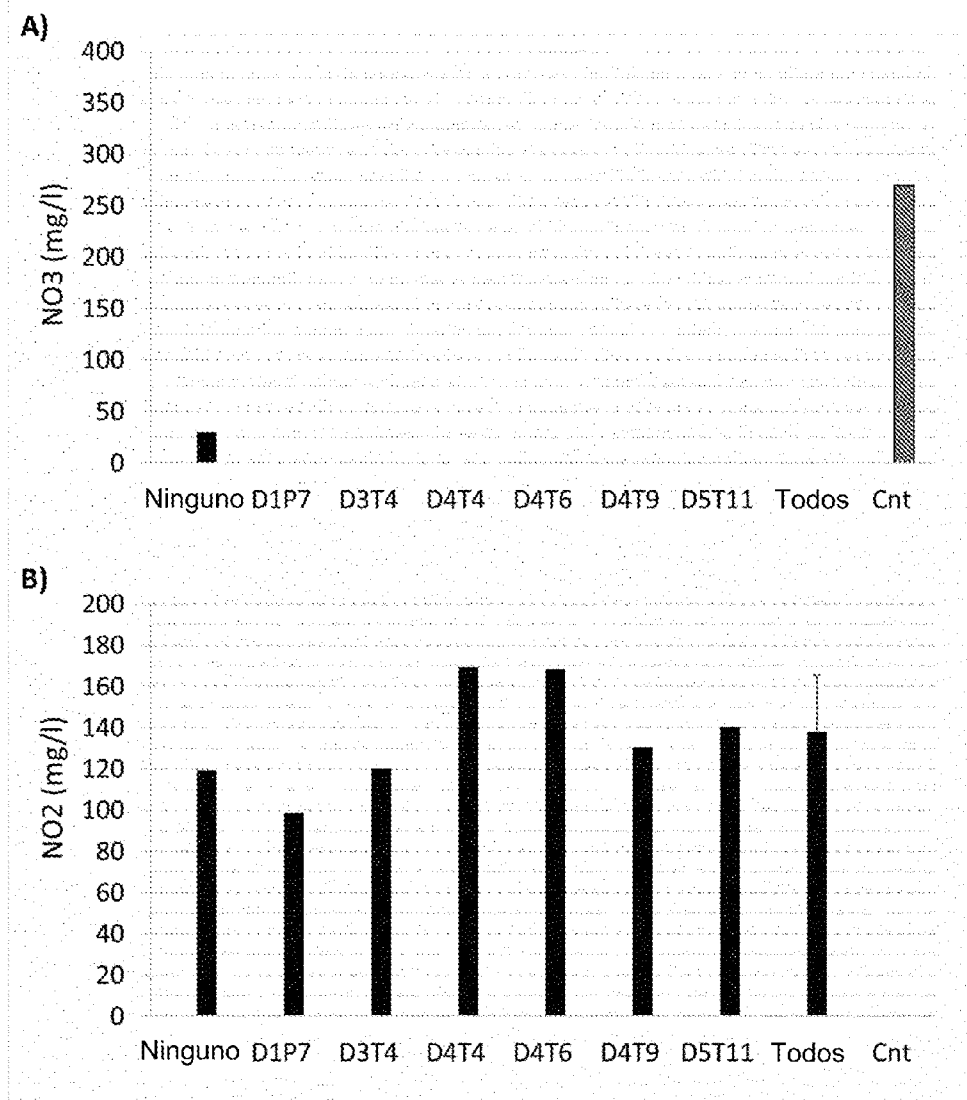


FIG. 11 (cont.1)

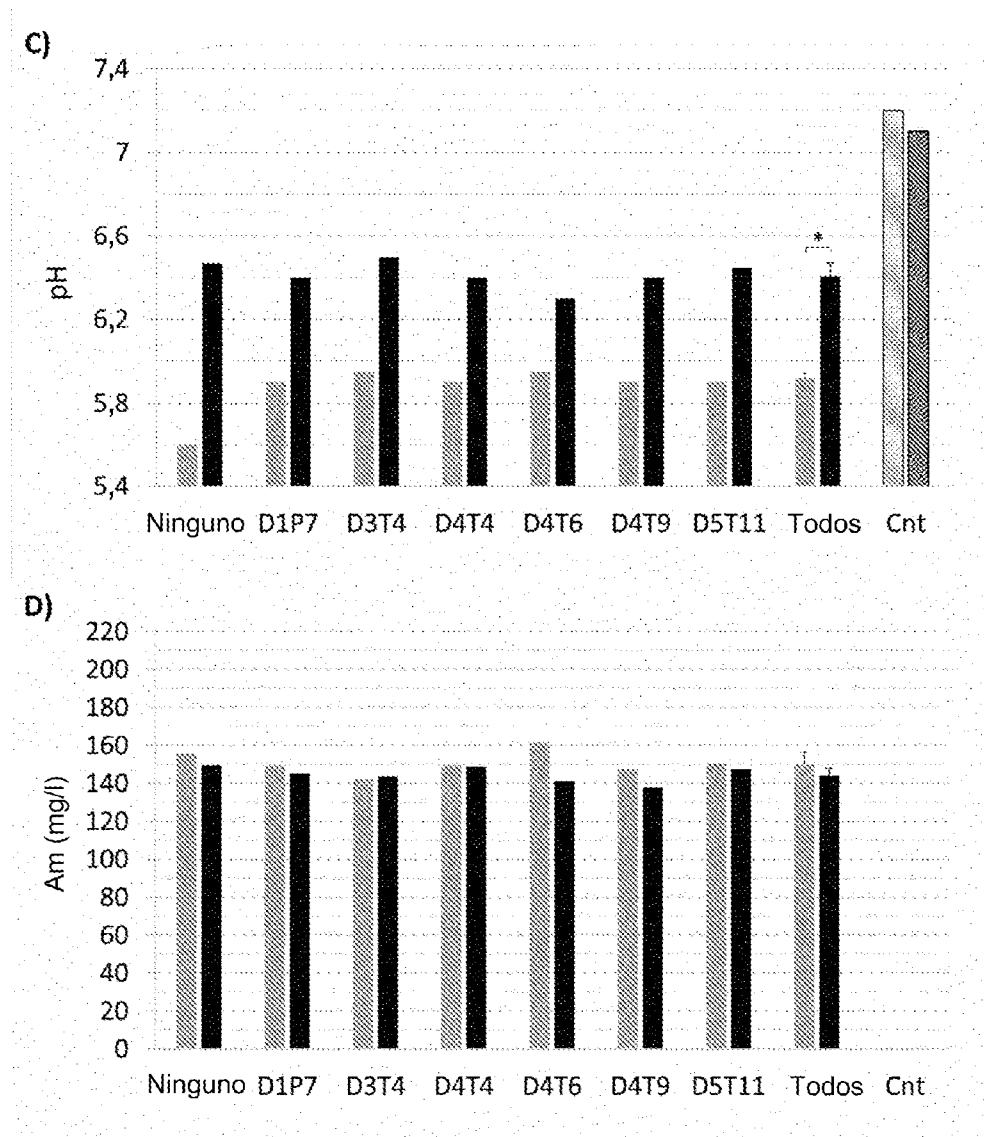


FIG. 11 (cont.2)

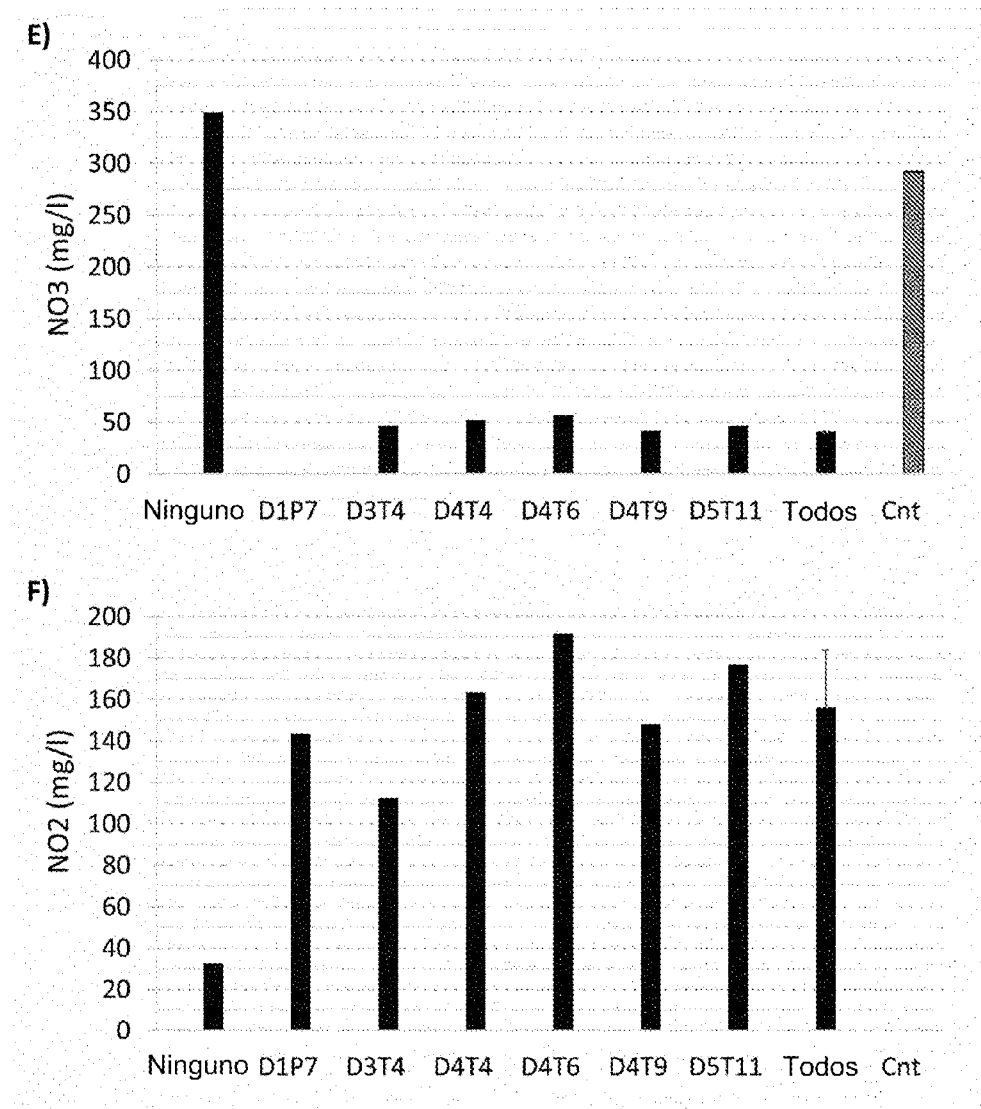


FIG. 11 (cont.3)

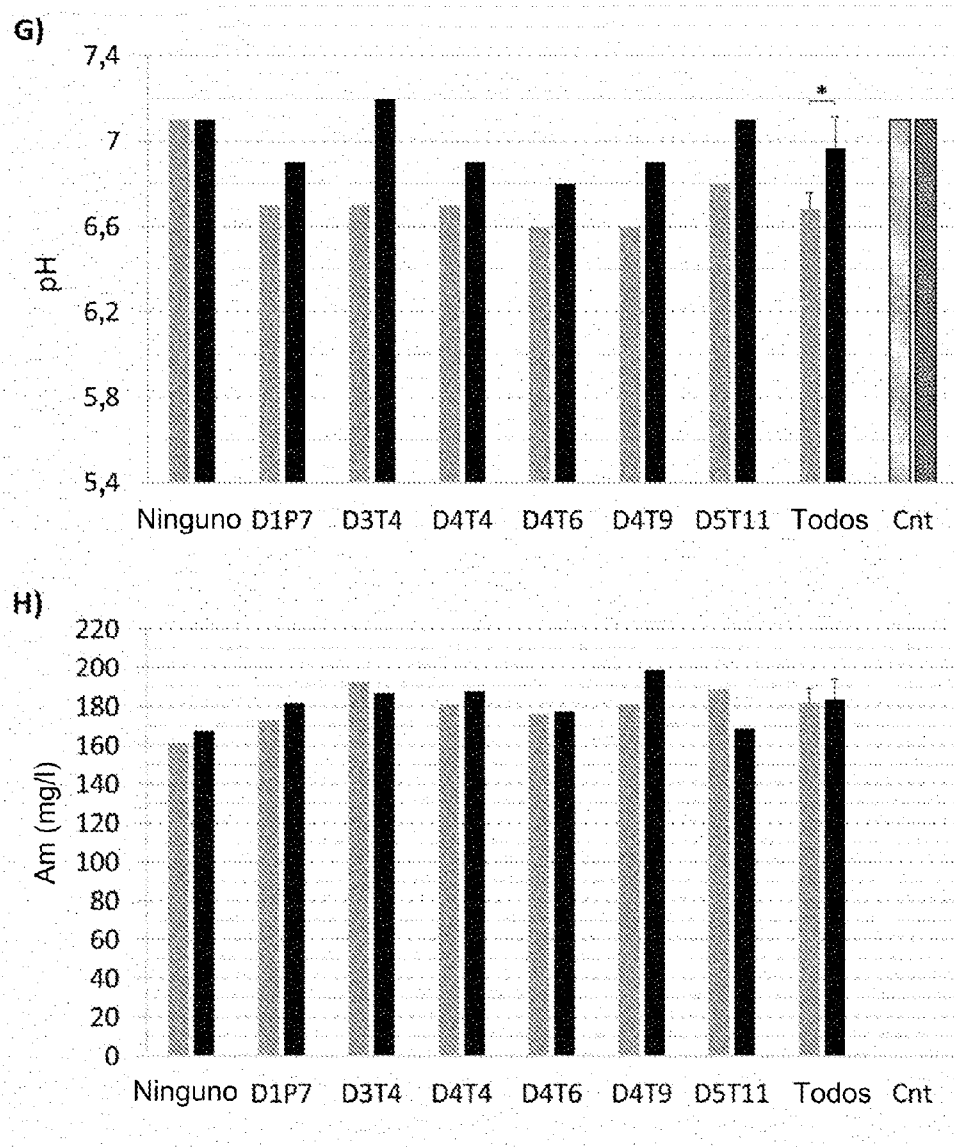


FIG. 12

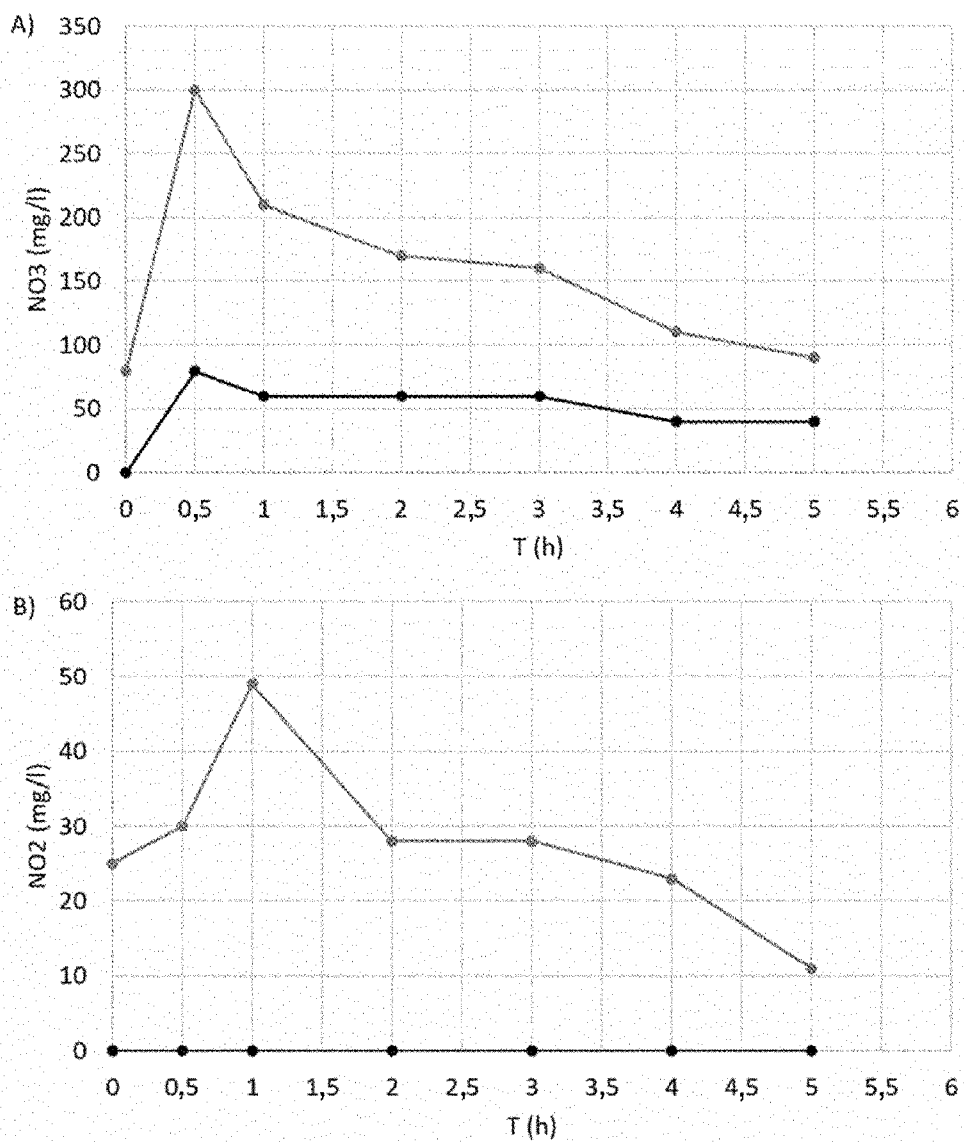
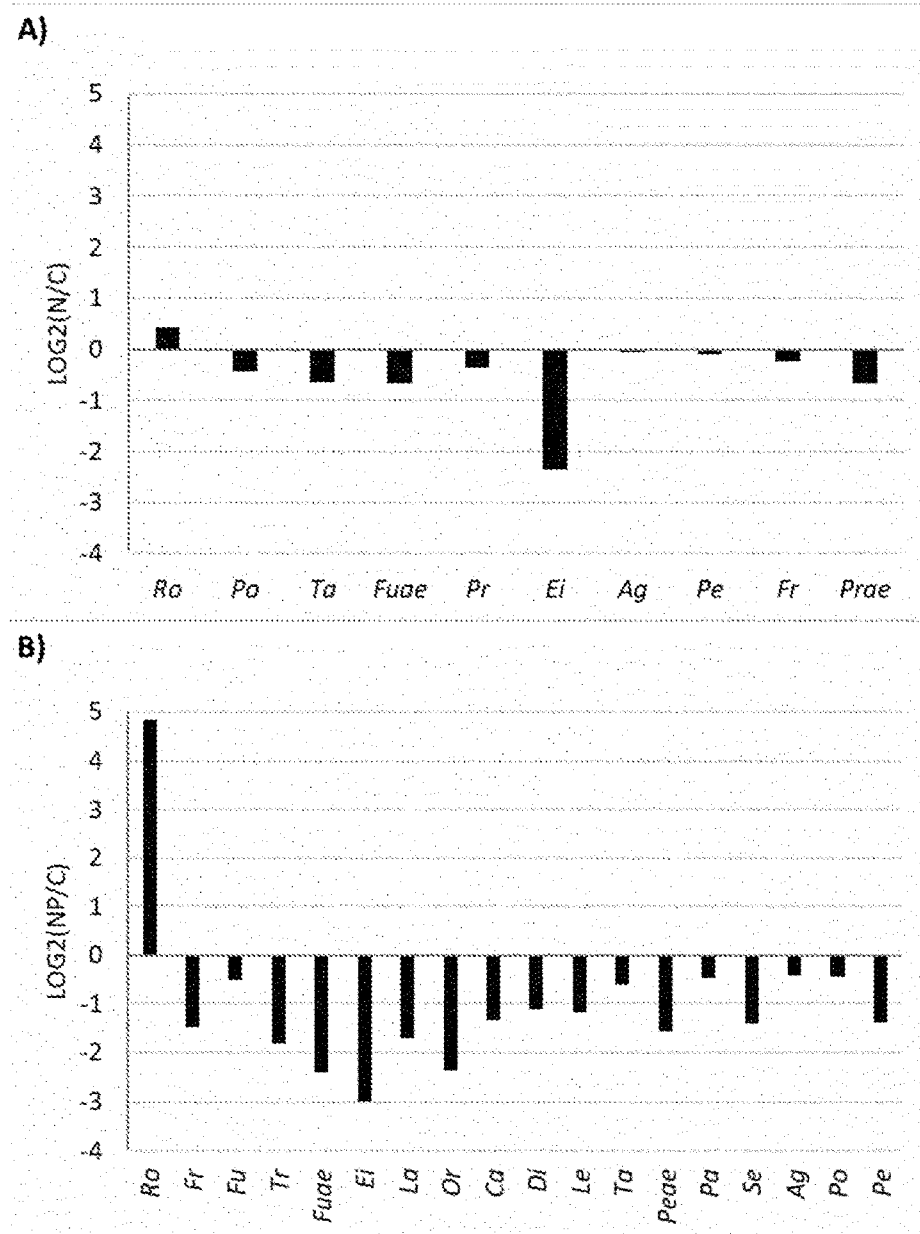


FIG. 13



19/24

FIG. 13 (cont.1)

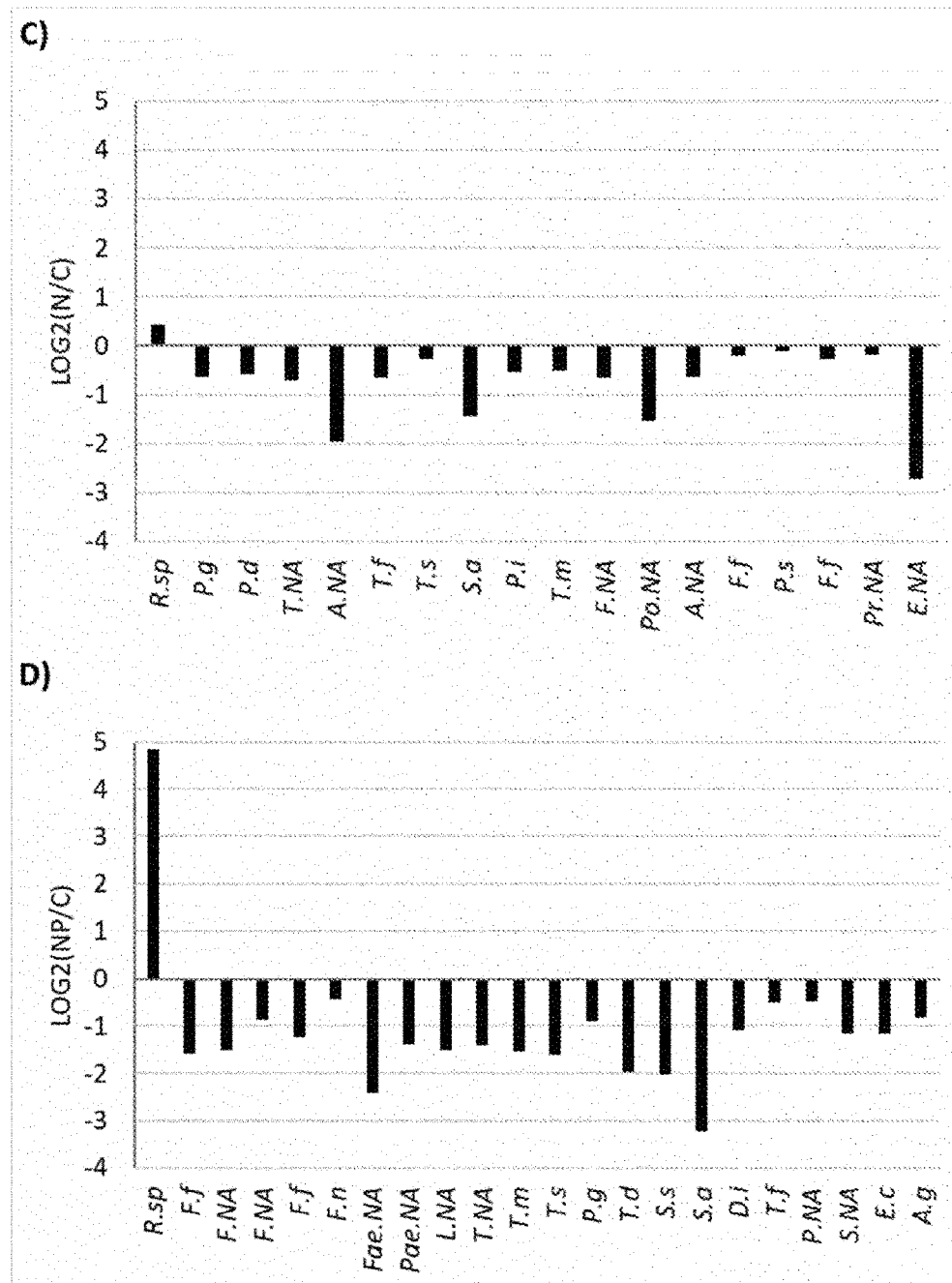


FIG. 14

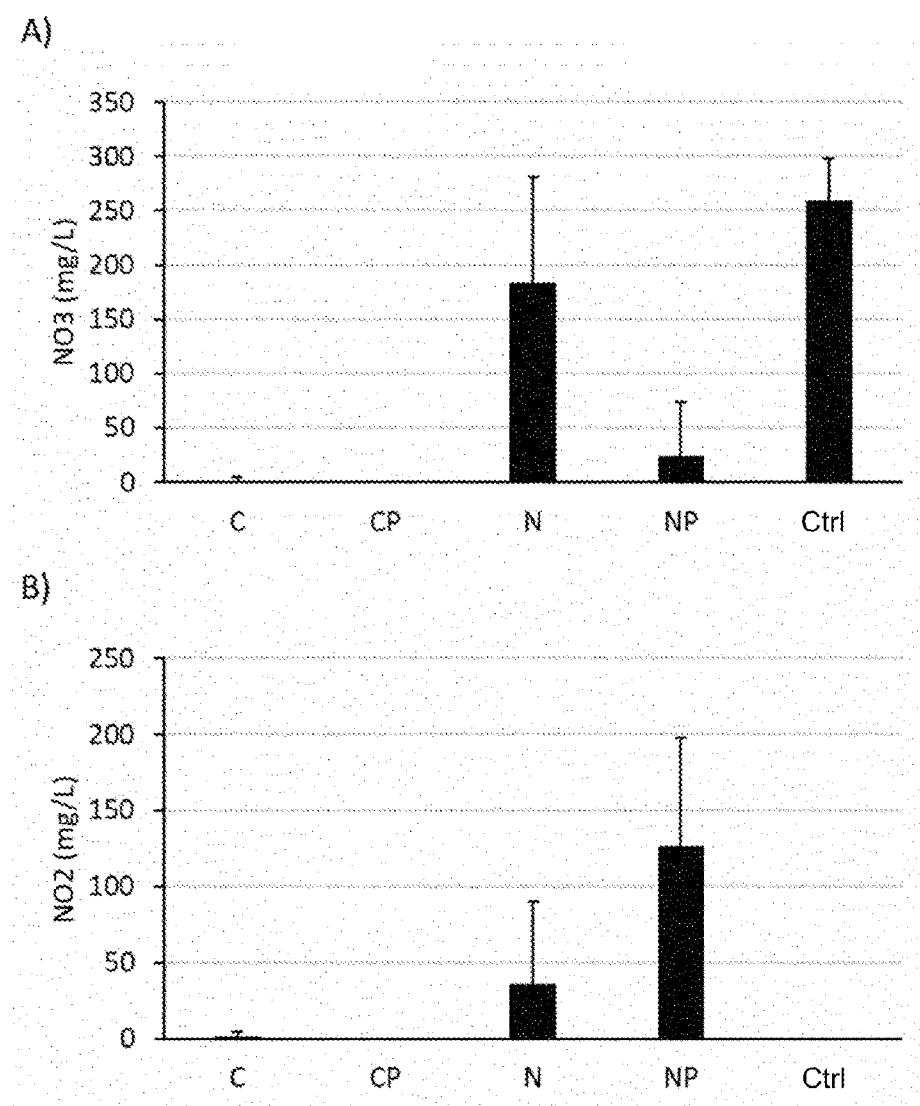
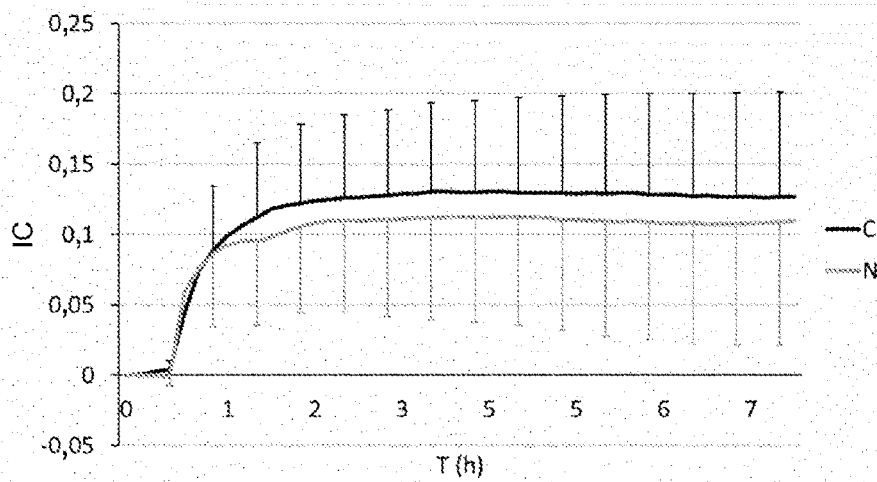


FIG. 14 (cont.1)

C)



D)

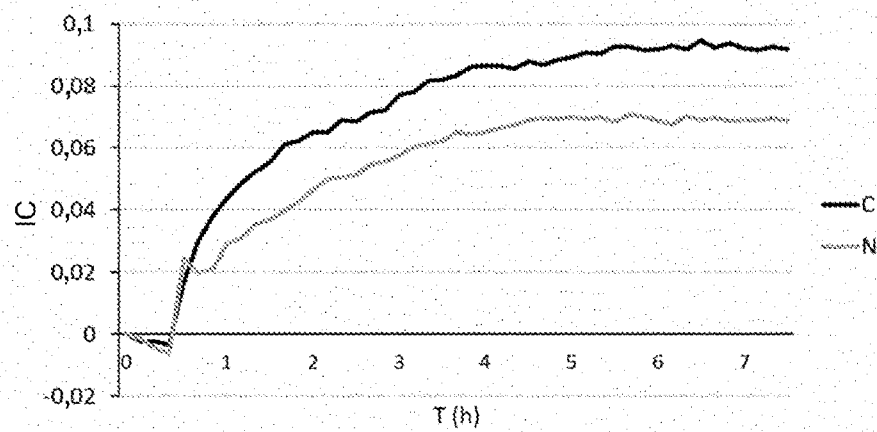


FIG. 14 (cont.2)

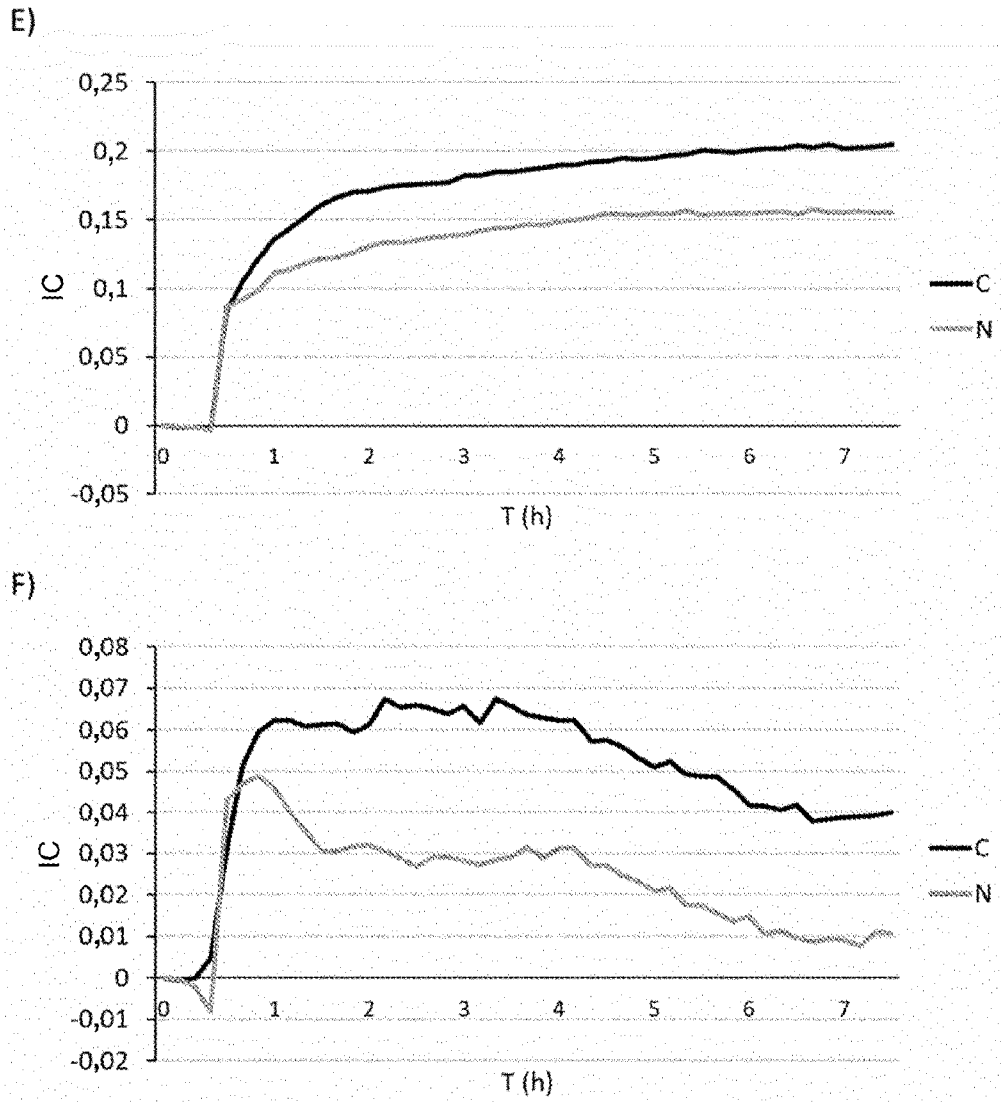


FIG. 15

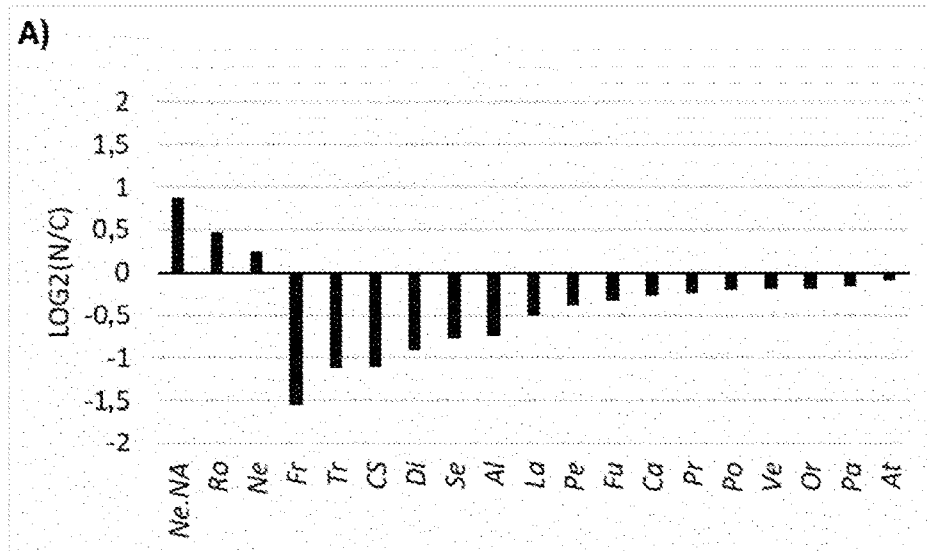


FIG. 15 (cont.1)

