



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

**EFECTO DE *Bifidobacterium dentium* SOBRE *Lactobacillus casei* A TRAVÉS
DE *QUORUM SENSING*, MEDIADO POR AUTOINDUCTOR-2**

Naomi Francesca Riquelme Vergara

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dra. Carla Lozano Moraga

Adscrito a Proyecto FONDECYT N°11150928

Santiago – Chile

2018



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

**EFECTO DE *Bifidobacterium dentium* SOBRE *Lactobacillus casei* A TRAVÉS
DE *QUORUM SENSING*, MEDIADO POR AUTOINDUCTOR-2**

Naomi Francesca Riquelme Vergara

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dra. Carla Lozano Moraga

Adscrito a Proyecto FONDECYT N°11150928

Santiago – Chile

2018

A mis padres, Sofía y Enrique por su apoyo incondicional.

A mis hermanos, Darian y Dylan.

Gracias por todo el amor, confianza y por acompañarme en cada una de mis etapas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres, por el gran esfuerzo que hacen a diario por mí y mis hermanos. Son las personas que me han acompañado en absolutamente todas mis etapas, me han apoyado en todas mis decisiones y nunca han dejado de creer en mí. Gracias por enseñarme cómo actuar frente a situaciones difíciles, aprender de los errores y levantarme para seguir luchando por mis sueños. Gracias a ustedes y a los valores que me han entregado soy la persona que soy. Los amo con toda mi alma y este logro va con especial dedicación para ustedes mis viejitos.

También a mis queridos hermanos, Darian y Dylan, por ser mis cómplices eternos, por llorar mis penas y celebrar mis alegrías. Son increíbles y grandiosas personas.

A mis amigas Caro, Gabi, Javi y Mane soy muy afortunada de tenerlas, esta etapa fue mucho más agradable y amena con ustedes a mi lado. Son las mejores, gracias a cada una por escucharme, entenderme y apoyarme. Las amo mucho.

Alonso mi gran amigo, gracias por esta amistad tan sincera y única, por todas las risas, confianza, momentos vividos y siempre estar a mi lado cuando más lo he necesitado.

A Felipe, por estar en las buenas y en las malas siempre. Eres grande, sé que puedo contar contigo para lo que sea.

A mi tía Sole, por ser mi vieja partner en todo ámbito, por quererme tal cual soy y escuchar todas mis historias, por siempre darme fuerzas y alegría para salir adelante.

Agradezco a mis primos, amigas de colegio, familia y a todas las personas que me ayudaron a cumplir mis sueños, que me dieron una mano cuando la necesité y me llenaron de ánimo y amor.

A mi tutora Claudia Lefimil, profe es una excelente profesional y persona, muchas gracias por la paciencia, atender todas mis inquietudes, darse el tiempo de explicarme y enseñarme. Además, por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto.

Al laboratorio de Bioquímica y Biología Oral muchas gracias por ayudarme en el proceso y tener tan buena disposición. Fue muy grato trabajar con ustedes.

Finalmente, me siento orgullosa por el esfuerzo, valentía y perseverancia que he tenido a lo largo de mi vida. Porque soy inmensamente feliz con lo que soy y lo que tengo, porque sé que vienen muchos nuevos proyectos que me seguirán haciendo crecer como persona.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Enfermedad de Caries.....	5
1.2 Hipótesis de la Placa Ecológica Extendida.....	7
1.3 <i>Lactobacillus</i> spp. y Caries Dental.....	8
1.4 <i>Bifidobacterium</i> spp. y Caries Dental.....	11
1.5 Formación de Biopelículas e Interacciones Bacterianas.....	13
1.6 Señalización Intercelular: <i>Quorum Sensing</i>	16
2. HIPÓTESIS.....	22
3. OBJETIVO GENERAL.....	22
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 Tipo de Estudio Realizado.....	23
5.2 Cepas Bacterianas y Condiciones de Cultivo.....	23
5.3 Procedimientos.....	24
5.3.1 Preparación sobrenadante de <i>B. dentium</i> ATCC 27534.....	24
5.3.2 Detección de AI-2 producido por <i>B. dentium</i> ATCC 27534.....	24
5.3.3 Obtención y preparación de saliva humana.....	25
5.3.4 Ensayos de adherencia de <i>L. casei</i> ATCC 4646.....	26
5.3.5 Formación de biopelículas de <i>L. casei</i> ATCC 4646.....	28
5.3.6 Análisis Estadísticos.....	30

6. RESULTADOS	31
6.1 Crecimiento de <i>B. dentium</i> ATCC 27534	31
6.2 Presencia y funcionalidad de AI-2 proveniente de <i>B. dentium</i> ATCC 27534 ...	32
6.3 Efecto de <i>B. dentium</i> ATCC 27534 en la adhesión de <i>L. casei</i> ATCC 4646....	33
6.4 Efecto de <i>B. dentium</i> ATCC 27534 en la formación inicial de biopelícula de <i>L. casei</i> ATCC 4646.....	35
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIÓN.....	45
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
10. ANEXOS Y APÉNDICES	54
11.1 Anexo 1.....	54
11.2 Anexo 2.....	55
11.3 Anexo 3.....	58

RESUMEN

Introducción. La caries dental es una enfermedad microbiológicamente inducida, provocando una pérdida de mineral debido a un desbalance en el pH del entorno. Se ha demostrado que a medida que aumenta la profundidad de la lesión, disminuye la diversidad microbiana y especies como *Bifidobacterium dentium* y *Lactobacillus casei* se encuentran muy frecuentemente. Las interacciones bacterianas se llevan a cabo mediante procesos de comunicación celular como *quorum sensing*, que consiste en la producción y detección de moléculas extracelulares conocidas como autoinductores, siendo uno de ellos el autoinductor-2 (AI-2).

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del autoinductor-2 producido por *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 en la adhesión y formación de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.

Metodología. Se utilizaron las cepas *L. casei* ATCC 4646 y *B. dentium* ATCC 27534, provenientes de lesiones de caries. Ambas fueron cultivadas en medio MRS, en anaerobiosis a 37°C. Se detectó la presencia y funcionalidad de AI-2 producido por *B. dentium* mediante la cepa reportera *Vibrio harveyi* BAA-1117TM, que produce luminiscencia en presencia de esta molécula. Para evaluar la adherencia se utilizó el ensayo MTT (Sigma®). En el análisis de formación de biopelículas se utilizaron cubreobjetos de vidrio embebidos en saliva, en condiciones estáticas y los resultados se observaron utilizando Microscopía Electrónica de Barrido. En ambos, se analizó la capacidad de *L. casei* de formar biopelículas en presencia y ausencia de AI-2 del sobrenadante de *B. dentium* y AI-2 sintetizado químicamente como control.

Resultados. Se detectaron cantidades significativas de AI-2 en el cultivo en fase estacionaria de *B. dentium*. Esta molécula es capaz de generar un aumento en la adhesión y formación de biopelículas de *L. casei*, que presenta baja adherencia en ausencia de ella.

Conclusiones. *B. dentium* es capaz de potenciar la adhesión y formación inicial de biopelícula de *L. casei*, posiblemente mediante la producción y secreción

de AI-2 al medio externo. Indicando que la comunicación celular mediada por AI-2, puede generar efectos positivos entre microorganismos cariogénicos. Estos hallazgos son útiles para comprender la naturaleza de la interacción entre estos microorganismos, así como los mecanismos de procesos fundamentales para su patogenicidad, como son la adhesión a superficies y la formación de biopelículas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Enfermedad de Caries

La caries es una enfermedad crónica que posee una alta prevalencia a nivel mundial y un impacto negativo tanto en la salud oral como sistémica de los individuos (MINSAL, 2017). La Organización Mundial de la Salud la define epidemiológicamente como una pandemia (Petersen, 2003). Según datos del Ministerio de Salud, la prevalencia de caries en Chile es de 17,5% a los 2 años, 49,6% a los 4 años, 70,4% a los 6 años, 62,5% a los 12 años y de un 99,4% en la población adulta de 65 a 74 años (MINSAL, 2017).

Corresponde a una enfermedad multifactorial y dinámica, provocada por la interacción entre la estructura dentaria, la biopelícula formada en la superficie del diente y azúcares; también juega un papel importante la influencia salival y genética del hospedero (Pitts y cols., 2017). Esta patología se desencadena cuando ocurre un desbalance ecológico en la microbiota oral, ya sea por factores ambientales o biológicos. Por lo tanto, la causa del inicio de las lesiones de caries son los microorganismos presentes en la biopelícula, puesto que fermentan los hidratos de carbono y generan ácidos orgánicos como subproducto de su metabolismo, provocando así un descenso del pH del medio. Este determinante ambiental influencia un cambio en las propiedades fenotípicas y genotípicas de los microorganismos, es decir, de adaptación y selección bacteriana, respectivamente (Takahashi y Nyvad, 2011; Grigalauskiéné y cols., 2015).

Naturalmente los microorganismos cariogénicos están presentes en la microbiota de un individuo sano, cuando el pH es neutro éstos son los menos prevalentes y solo ocupan una pequeña parte de la biopelícula. Al alterarse la homeostasis del medio, con periodos prolongados bajo el pH crítico de desmineralización de esmalte y dentina (pH 5,5), el ciclo desmineralización/remineralización se inclina hacia una pérdida neta de mineral y además condiciona a una selección de microorganismos acidogénicos (productores de ácidos) y acidúricos (resistentes y funcionales en un ambiente ácido), mientras que las especies asociadas al esmalte sano son más sensibles y poco tolerantes a las condiciones ambientales ácidas (Marsh, 2003; Grigalauskiéné y cols., 2015).

Se han desarrollado tres principales hipótesis sobre la etiología de la enfermedad de caries:

a) *Hipótesis de placa específica* (Loesche, 1992): se propone que sólo algunas especies específicas están involucradas en el inicio de la lesión, tales como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Inicialmente, se identificó a *S. mutans* como el principal agente etiológico de las lesiones de caries, puesto que es aislado con frecuencia desde lesiones cavitadas. Es altamente acidogénico y acidúrico, es capaz de inducir a la formación de caries en animales con una dieta rica en sacarosa y además posee la habilidad de adherirse a la superficie dentaria y a otros microorganismos (Hamada y Slade, 1980; Loesche, 1986). Sin embargo, investigaciones recientes han establecido que la enfermedad de caries se puede desarrollar incluso en ausencia de este microorganismo, 10-20% de los individuos con esta patología presentan niveles no detectables o muy bajos de *S. mutans*, pero sí de otras especies productoras de ácidos (Aas y cols., 2008).

b) *Hipótesis de placa no específica* (Theilade, 1986): se propone que la lesión de caries es el resultado de la actividad conjunta de la biopelícula, la cual está compuesta por una gran variedad de especies diferentes. Estudios actuales, establecen que *S. mutans* puede ser la especie dominante de la biopelícula durante el inicio de la enfermedad, pero otras especies como *Streptococcus* spp. del tipo no mutans, *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Veillonella* spp. y *Propionibacterium* spp., pueden complementar o reemplazar a *S. mutans* en el proceso patológico de la caries dental (Aas y cols., 2008; Takahashi y Nyvad, 2011).

c) *Hipótesis de placa ecológica* (Marsh, 1994): se propone que la lesión de caries es el resultado de una variación en la microbiota residente, debido a cambios en las condiciones ambientales locales. Dentro de la boca existen diversas superficies que pueden ser colonizadas por microorganismos, y la microbiota presente en cada una varía en composición; incluso existen diferencias entre las comunidades microbianas de las distintas superficies del diente. Según Marsh (2003), la enfermedad de caries no necesita tener una etiología microbiana específica, ya que cualquier especie con características relevantes, como ser acidogénicas y/o acidúricas, puede contribuir con esta patología; por lo tanto, las

propiedades del medio establecen la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota residente, debido a que existe una relación directa y dinámica entre el entorno y los microorganismos. Esta hipótesis corresponde a la más aceptada en la actualidad, dando origen a una hipótesis extendida.

1.2 Hipótesis de la Placa Ecológica Extendida

Actualmente, se ha replanteado el proceso de caries desde una perspectiva microbiológica, bioquímica, ecológica y clínica. Takahashi y Nyvad (2008), plantearon una extensión de la hipótesis de la placa ecológica, para explicar la relación que existe entre los cambios dinámicos que ocurren en las propiedades fenotípicas/genotípicas de la biopelícula y el balance de desmineralización/remineralización en la enfermedad de caries.

La hipótesis extendida de placa ecológica describe tres etapas donde la biopelícula funciona como un ecosistema dinámico (Figura 1) (Takahashi y Nyvad, 2011):

a) Etapa de estabilidad dinámica: Ocurren leves e infrecuentes episodios de acidificación del medio, por lo que el balance mineral puede ser controlado fácilmente a favor de la remineralización. Predominan especies del género *Streptococcus* del tipo no mutans y del género *Actinomyces*, composición microbiana que se encuentra generalmente en las superficies del esmalte clínicamente sanas.

b) Etapa acidogénica: Episodios moderados y frecuentes de acidificación del medio. Cuando el equilibrio se altera por un tiempo prolongado, puede provocar el inicio de una lesión de caries dental, ya que el balance está a favor de la desmineralización. Predominan especies del género *Streptococcus* del tipo no mutans de bajo pH y del género *Actinomyces*.

c) Etapa acidúrica: Episodios severos y prolongados de acidificación del medio. En condiciones extremadamente ácidas, las especies del género *Streptococcus* del tipo no mutans y del género *Actinomyces* serán eliminadas y remplazadas por especies más acidúricas como *S. mutans*, *Lactobacillus* spp. y

Bifidobacterium spp. Por lo tanto, existirá una gran pérdida neta de minerales y una rápida progresión de la lesión.

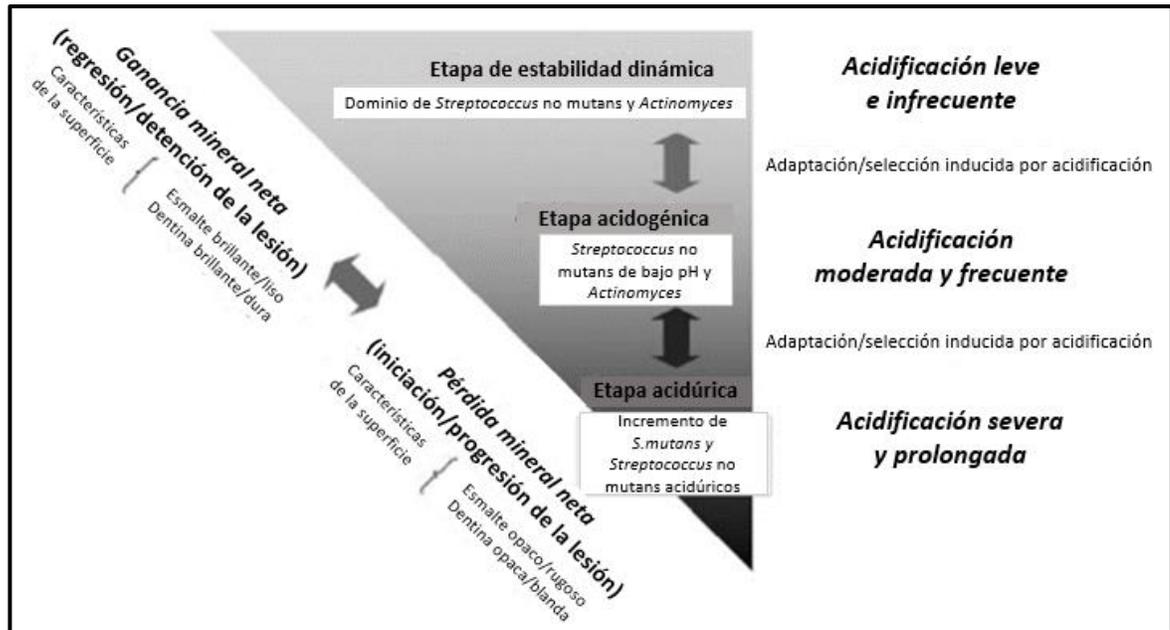


Figura 1. Hipótesis de Placa Ecológica Extendida. Etapa de estabilidad dinámica, etapa acidogénica y etapa acidúrica (Modificado de Takahashi y Nyvad, 2011).

Se ha demostrado que a medida que aumenta la profundidad de la lesión de caries, el ambiente se vuelve más ácido y anaeróbico. En estas condiciones se puede observar una disminución en la diversidad filogenética y variación en la composición de la población microbiana (Kianoush y cols., 2014). Diversos estudios relacionan a especies acidogénicas y acidúricas, como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., con lesiones cariosas (Aas y cols., 2008; Beighton, 2008). En el frente de avance de una lesión de caries dentinaria profunda, es poco frecuente encontrar *S. mutans*, sin embargo, *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp. y *Bifidobacterium* spp. son prevalentes (Chhour y cols., 2005; Aas y cols., 2008; Kianoush y cols., 2014).

1.3 *Lactobacillus* spp. y Caries Dental

El género *Lactobacillus* pertenece a la familia *Lactobacillaceae*. Son bacterias Gram positivo, con morfología de vara (Figura 2), carentes de motilidad, anaeróbicas estrictas o facultativas, altamente acidogénicas y acidúricas (Cannon y cols., 2005; Klinke y cols., 2009). Generalmente son considerados microorganismos

no patógenos incluso beneficiosos, ya que forman parte de la microbiota comensal del tracto gastrointestinal y vaginal humano (revisado en Caufield y cols., 2007). Caufield y cols. (2007) mediante estudios genotípicos proponen al género *Lactobacillus* como colonizadores exógenos y oportunistas, provenientes de los alimentos u otras fuentes externas a la cavidad oral. Algunas de estas especies se utilizan como bacterias probióticas, ya sea en forma liofilizada o como producto alimenticio fermentado (Cannon y cols., 2005).

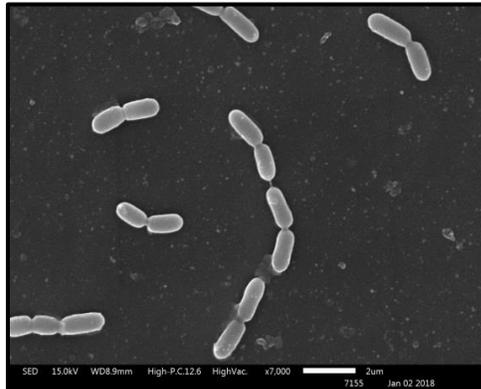


Figura 2. Fotomicrografía por Microscopía Electrónica de Barrido de *Lactobacillus casei* ATCC 4646 sobre discos de vidrio embebidos con saliva. Magnificación 7000x. Imagen obtenida en este estudio.

Lactobacillus spp. juega un papel fundamental en el ecosistema oral, tanto en salud como en enfermedad. Colonizan la cavidad oral durante los primeros años de vida y se pueden encontrar en grandes cantidades en la saliva, dorso de la lengua, mucosas, paladar duro y en menor medida en las superficies dentarias (revisado en Badet y Thebaud, 2008). Es ampliamente reconocido como un microorganismo cariogénico, ya que es frecuentemente encontrado en lesiones de caries dentinarias profundas (Klinke y cols., 2009). Además, se ha demostrado que *Lactobacillus* spp. es capaz de adherirse a diversas especies bacterianas y su mecanismo de adhesión involucra un cierto grado de especificidad (Badet y Thebaud, 2008).

Se ha observado que están más asociados con lesiones de caries avanzada que con lesiones limitadas a esmalte (Chhour y cols., 2005). Además, la presencia de estos microorganismos en las lesiones de caries depende del tamaño de la

cavidad, ya que son más numerosos en aquellas lesiones medianas y grandes (Bönecker y cols., 2003; Kianoush y cols., 2014).

Las características más conocidas de *Lactobacillus* spp. son su capacidad de crecer y sobrevivir en ambientes de bajo pH y la producción de ácido láctico. Estas bacterias pueden disminuir el pH ambiental hasta valores inferiores a 4,5 y son capaces de sobrevivir en un pH de hasta 2,2 (revisado en Badet y Thebaud, 2008). Klinke y cols. (2009) demostraron que son capaces de continuar secretando cantidades significativas de ácido cuando el pH del medio es 4.

En un estudio realizado por Marchant y cols. (2001), se analizó las especies de *Lactobacillus* predominantes en dentina cariada de niños preescolares, siendo las más frecuentemente encontradas *L. casei*, *L. fermentum* y *L. rhamnosus*. Por otro lado, Callaway y cols. (2013), identificaron diversas especies de *Lactobacillus* aisladas desde muestras de lesiones de caries dentinarias en molares temporales, dentro de las cuales encontraron *L. casei*, *L. gasseri*, *L. paracasei* subespecie *paracasei*, *L. paracasei* subespecie *tolerans*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus*. Estos autores también detectaron que luego de la remoción de la dentina infectada, el recuento de *Lactobacillus* spp. en la dentina afectada subyacente se redujo considerablemente, encontrándose solamente las especies *L. rhamnosus* y *L. paracasei* subespecie *paracasei*.

En una revisión de la literatura, se indica que numerosos autores, mediante diversas técnicas y métodos de muestreo, identificaron *L. casei* como la especie más predominante en tejidos cariados (Badet y Thebaud, 2008). Lima y cols. (2011), investigaron la carga bacteriana presente en las diferentes capas dentinarias de lesiones cariosas en adolescentes, encontrando que *L. casei* y *L. fermentum* estaban presentes en todas las capas analizadas y fueron las especies más prevalentes en las capas internas. Wolff y cols. (2013), analizaron la composición bacteriana de la dentina en adultos con caries y libres de éstas, encontrando que *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. lactis* y otras especies, fueron las más frecuentes.

En Chile, en un estudio previo en el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, se analizaron las especies de *Lactobacillus* presentes en la cavidad oral de 8 niños

chilenos libres de lesiones de caries y de 9 niños chilenos con lesiones de caries, obteniendo desde todas las muestras de lesiones de caries profundas, altos recuentos de *Lactobacillus* spp. Además, en la saliva de los niños con caries y en las muestras de lesiones de caries, *L. salivarius* y *L. casei* fueron respectivamente las especies aisladas con mayor frecuencia. *L. rhamnosus* fue predominante en ambos grupos de estudio (Luzanto, 2016).

1.4 *Bifidobacterium* spp. y Caries Dental

El género *Bifidobacterium* pertenece a la familia *Bifidobacteriaceae*. Son bacterias Gram positivo, acidogénicas y acidúricas, anaeróbicas, no filamentosas, no motiles y pleomorfas ramificadas (Figura 3). Estos microorganismos tienen efectos beneficiosos para la salud humana cuando habitan el tracto gastrointestinal, por lo que algunas especies han sido utilizadas como probióticos en ciertos alimentos y como complementos terapéuticos (Ventura y cols., 2009). Sin embargo, existen especies que han sido aisladas de la cavidad oral humana, donde su presencia está ligada a la progresión de la enfermedad de caries (Aas y cols., 2008; Ventura y cols., 2009; Mantzourani y cols., 2009a). También pueden ser aisladas de otros nichos como el tracto gastrointestinal de animales e insectos, alimentos lácteos y aguas residuales (Mantzourani y cols., 2009b).

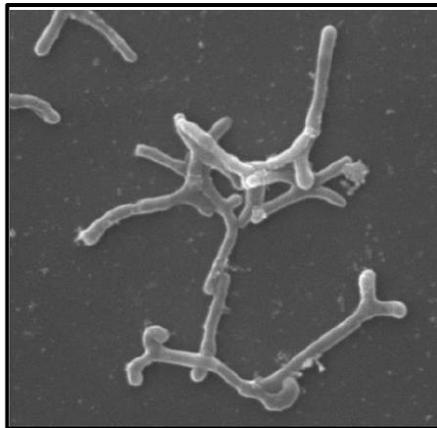


Figura 3. Fotomicrografía por Microscopía Electrónica de Barrido de *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 sobre discos de vidrio embebidos con saliva. Magnificación 4500x (García, 2017).

En un estudio realizado por Mantzourani y cols. (2009b), se analizó la presencia de miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* en muestras clínicas

obtenidas desde superficies radiculares sanas, determinando que existe una menor proporción de *Bifidobacterium* spp. en la biopelícula supragingival de superficies sanas radiculares expuestas y una mayor proporción en la dentina de lesiones radiculares blandas y activas y en lesiones radiculares detenidas y remineralizadas. En estas últimas, *B. dentium* fue la especie más prevalente, seguido de *B. subtile* y *B. breve*.

La variedad de *Bifidobacterium* spp. presente en lesiones de caries dentinarias y en la biopelícula supragingival está limitada a la especie *B. dentium* (Modesto y cols., 2006). La especie predominante en una cavidad oral dentada es *B. dentium*, aunque se ha encontrado igualmente *B. breve*, *B. subtile*, *B. adolescentis*, *B. urinalis* y *B. longum*, las cuales corresponden a especies no orales, sugiriendo que pueden colonizar la cavidad oral de forma transitoria (Mantzourani y cols., 2009b).

Beighton y cols. (2008) encontraron que el 94% de las muestras de saliva de sujetos adultos sin caries, poseían especies de la familia *Bifidobacteriaceae*, de las cuales *B. dentium* fue aislado en el 82,2% de los individuos y *B. longum* en un 10,8%. *B. dentium* también ha sido aislado, en un alto porcentaje, de lesiones de caries oclusales activas en niños, pero no así desde las superficies sanas. Estos resultados confirman la posible contribución de *Bifidobacterium* spp. en el proceso de caries, pudiendo establecer que ésta, al igual que otras bacterias cariogénicas, aumenta en número y proporción frente a un cambio en el ambiente oral, provocado por una mayor ingesta de hidratos de carbono fermentables y el posterior descenso de pH (Mantzourani y cols., 2009a).

En un análisis genético de secuencias genómicas, se comparó entre especies del género *Bifidobacterium* que se encuentran en el intestino humano y *B. dentium*, detectando que esta especie posee adaptaciones genéticas específicas para colonizar la cavidad oral y proliferar en lesiones de caries activas. Dentro de estas adaptaciones se encuentran los genes que codifican factores de virulencia como las adhesinas, tolerancia al ácido, defensa contra sustancias tóxicas y la capacidad de utilizar los componentes derivados de la saliva (Ventura y cols., 2009).

Algunas especies de *Bifidobacterium* son capaces de producir ácido en presencia de glucosa y disminuir el pH bajo 4,2, lo suficiente para causar la desmineralización de los tejidos dentarios (van Houte y cols., 1996; Haukioja y cols., 2008). Nakajo y cols. (2010), establecieron que *B. dentium* y *B. longum* son capaces de disminuir el pH del medio bajo 5,0, creando un ambiente ácido en la biopelícula y en las lesiones de caries, concluyendo que estos microorganismos deben poseer mecanismos de adaptación para protegerse frente a la acidificación del medio en ausencia de una fuente de energía.

En Chile, en un estudio preliminar del laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, se analizó la presencia de las especies del género *Bifidobacterium* (Burgos y cols., 2014, comunicación personal) en muestras de saliva de 10 niños chilenos libres de caries y 10 niños chilenos con lesiones de caries profundas. Además, se estudiaron las especies de *Bifidobacterium* presentes en la saliva de adultos sin lesiones de caries y con lesiones de caries profundas (Pérez y cols., 2014, comunicación personal). En la saliva de los niños con lesiones de caries, *B. dentium* fue la especie más frecuentemente aislada; en cambio en la saliva de los adultos con lesiones de caries, *B. dentium*, *B. longum* y *B. adolescentis* fueron las especies más predominantes.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, *L. casei* y *B. dentium* han sido especies frecuentemente aisladas desde lesiones de caries profundas y muestras salivales de individuos con lesiones de caries, lo cual nos indica que estos patobiontes poseen mecanismos de adaptación para sobrevivir en este ambiente, así como mecanismos de interacción para coexistir. Algunas de las estrategias descritas que facilitan la permanencia de estos microorganismos son la resistencia a ácido, la capacidad de adherirse y la formación de biopelículas.

1.5 Formación de Biopelículas e Interacciones Bacterianas

En la cavidad oral, la mayoría de los microorganismos se encuentran asociados en biopelículas, las cuales corresponden a comunidades bacterianas organizadas en una matriz extracelular de diferentes tipos de biopolímeros. Así, la matriz está compuesta por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos

provenientes de las células del hospedero y/o de los microorganismos presentes en la cavidad oral (Flemming y Wingender, 2010; Jenkinson, 2011). Los diferentes biopolímeros forman un andamio para la arquitectura tridimensional de la biopelícula y son responsables de la adhesión a las superficies, agregación bacteriana y de la co-adhesión dentro de ella. También actúan como barrera protectora, retienen agua, ayudan en la absorción de componentes orgánicos e inorgánicos, poseen actividad enzimática y son una fuente de nutrientes. Además, inmovilizan a los microorganismos de la biopelícula y los mantiene próximos, permitiendo interacciones entre ellos, como la comunicación metabólica, intercambio genético y la formación de un micro-consorcio sinérgico (Hojo y cols., 2009; Flemming y Wingender, 2010). Según Kutsch (2014), las biopelículas son una colección de microorganismos diferentes, pero que colectivamente se comportan como un “súper-organismo”.

En la cavidad oral, son numerosas las ventajas que obtienen los microorganismos al estar organizados en biopelículas y no de forma planctónica, ya que se encuentran continuamente sometidos a cambios, incluyendo variaciones en la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, fluctuaciones de pH, así como expuestos a las propiedades antimicrobianas de la saliva (revisado en Wright y cols., 2013).

La formación de la biopelícula dental se inicia con la adhesión reversible de los colonizadores primarios a la película salival adquirida que se formó en la superficie dentaria, formando una monocapa de microorganismos (Figura 4). La película salival adquirida corresponde a una delgada capa de proteínas salivales que se deposita y adsorbe rápidamente en la superficie dentaria, incluso después de haber sido cepillada meticulosamente (Hojo y cols., 2009; Jenkinson, 2011). Luego mediante la co-adhesión, que corresponde a la unión de los colonizadores secundarios a las células ya adheridas, se forman multicapas celulares que permiten la creación de una matriz celular. A continuación, ocurre el crecimiento y multiplicación celular, y en ocasiones el desprendimiento de algunos microorganismos (Figura 4) (Marsh, 2006; Ávila y cols., 2009).

Las condiciones ambientales se modifican durante el desarrollo de la biopelícula debido al metabolismo de los colonizadores primarios, los cuales, al ser

anaerobios facultativos agotan el oxígeno y producen dióxido de carbono e hidrógeno, creando un entorno más adecuado para el crecimiento de los colonizadores posteriores, donde la mayoría son estrictamente anaerobios y capaces de sobrevivir en un ambiente de menor pH (Marsh, 2003).

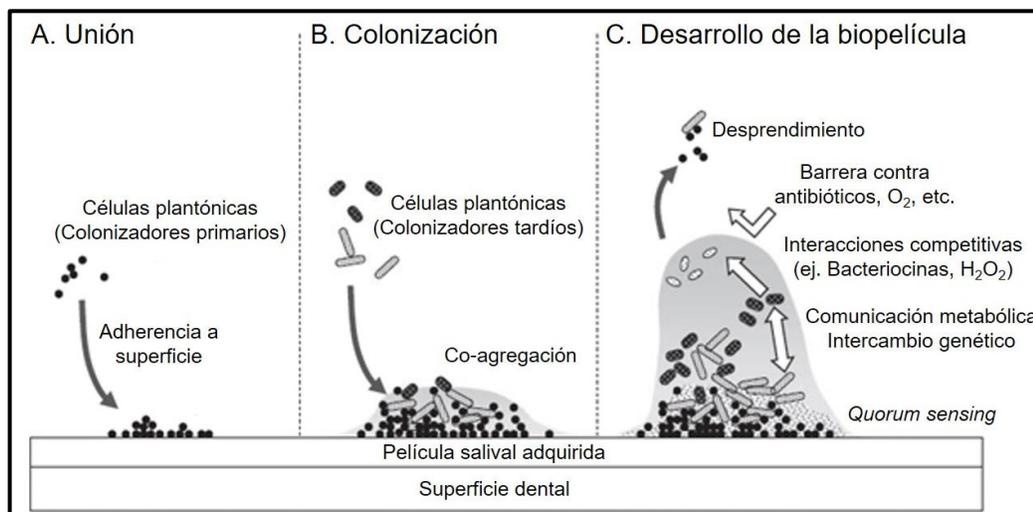


Figura 4. Representación esquemática de la formación de biopelículas en la superficie del diente y los posibles roles de las interacciones bacterianas. A. En la biopelícula dental generalmente se adhieren los colonizadores primarios. B. La co-agregación contribuye a la unión y colonización secuencial de microorganismos. C. Las interacciones bacterianas incluyen la comunicación metabólica y el intercambio genético. El desarrollo de una biopelícula con una alta densidad de células bacterianas aumenta la concentración de moléculas de señalización y funciona como una barrera contra factores nocivos como antibióticos y oxígeno (Modificado de Hojo y cols., 2009).

Las enfermedades mediadas por biopelículas se producen debido a desequilibrios en la microbiota residente, debido a un enriquecimiento de microorganismos patógenos (Marsh y cols. 2006). Para mantener el equilibrio ecológico dentro de las comunidades microbianas se producen interacciones competitivas o cooperativas, es decir, se producen intercambios metabólicos entre los microorganismos de una misma o diferente especie (Figura 4) (Jenkinson, 2011; Guo y cols., 2014).

Por otra parte, para coordinar las respuestas a los cambios ambientales, comportamiento fisiológico y patogénesis, se ha descrito que la integridad de la comunidad en la biopelícula se mantiene mediante adhesión intermicrobiana y sistemas de comunicación complejos (señalización intercelular). Existen

interacciones dependientes de contacto como la señalización célula-célula, la cual se produce en respuesta a la asociación física de los microorganismos con los tejidos del hospedero o con superficies celulares bacterianas, pero también encontramos interacciones independientes de contacto como la comunicación metabólica y el *quorum sensing* (Blango y Mulvey, 2009; Wright y cols., 2013). Se han estudiado numerosas interacciones bacterianas presentes entre distintas especies de la cavidad oral, sin embargo, aún no existen estudios publicados sobre el sistema de comunicación existente entre especies del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

1.6 Señalización Intercelular: *Quorum Sensing*

La señalización intercelular permite a los residentes de la comunidad microbiológica modular la expresión génica, de acuerdo con las condiciones del entorno, y coordinar sus comportamientos en la regulación de expresión de factores de virulencia, adaptación metabólica, iniciación de competencia y en el desarrollo de la biopelícula (Guo y cols., 2014).

La señalización independiente de contacto, mediada por moléculas difusibles de autoinducción o *quorum sensing* es un proceso de comunicación química bacteriana que controla de manera sincronizada la expresión génica frente a cambios en la densidad celular y complejidad de las especies de una población, siendo el comportamiento bacteriano al unísono y colectivo (Ng y Bassler, 2009). Este sistema influye en funciones como la virulencia, tolerancia ácida y formación de biopelículas, y es considerado una de las funciones importantes de los microorganismos dentro de la comunidad, ya que en una biopelícula existe una alta densidad celular (Hojo y cols., 2009).

Existen moléculas de bajo peso molecular, sintetizadas intracelularmente, denominadas autoinductores, las cuales son liberadas al exterior aumentando en cantidad a medida que aumenta el número de células. Cuando la concentración extracelular de estas moléculas sobrepasa el umbral mínimo requerido para la detección, se unen a receptores afines y se activan las cascadas de transducción de señales provocando cambios en la expresión génica de toda la población (Ng y Bassler, 2009).

Los microorganismos Gram positivo se comunican mediante autoinductores, por dos sistemas diferentes de señalización. El primero descrito consiste en oligopéptidos codificados genéticamente como autoinductores, denominados Péptidos de Autoinducción (Ng y Bassler, 2009; Guo y cols., 2014). Esta comunicación ha sido descrita en *S. mutans* y *S. gordonii* para intercambio genético y potenciar la virulencia (Wright y cols., 2013). El segundo sistema, implica una familia de moléculas de señalización producidas por la enzima LuxS, denominadas autoinductores-2 (AI-2). Tal como se puede observar en la Figura 5, la enzima LuxS produce 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), el cual corresponde a un precursor que genera un grupo de moléculas interconvertibles de furanosilo denominadas genéricamente como AI-2. DPD es producido desde S-ribosil-homocisteína (SRH), el que es hidrolizado por la enzima LuxS produciendo homocisteína y DPD, el cual es inestable y espontáneamente se convierte en distintas moléculas de AI-2 (Sun y cols., 2004; Buck y cols., 2009; Ng y Bassler, 2009). Esta reacción, catalizada por la enzima LuxS, es una etapa del Ciclo Metilo Activado, el cual es una vía metabólica importante para la biosíntesis de metionina *de novo* (Hardie y Heurlier, 2008).

AI-2, como molécula de señalización, regula la expresión de diversos fenotipos como factores de virulencia, procesamiento de ADN, morfología celular, motilidad, formación de biopelículas, producción de toxinas, producción de luminiscencia y división celular (revisado en Buck y cols., 2009). Se ha visto también que el metabolismo de carbohidratos está integrado con los sistemas de señalización vía AI-2; las condiciones ambientales que perduran por un tiempo prolongado, influenciadas por la dieta, pueden tener un papel importante en la actividad de regulación génica dentro de la comunidad microbiana. Diferentes carbohidratos influyen en la expresión de vías metabólicas específicas y tienen un impacto sobre los mecanismos que controlan la integridad celular y la secreción de la matriz extracelular en la biopelícula (Wright y cols., 2013).

McNab y cols. (2003), identificaron que *S. gordonii* DL1 posee un gen *luxS* funcional y por ende también la proteína LuxS, cuya vía controla aspectos importantes del metabolismo de carbohidratos y la formación de biopelículas mixtas entre *S. gordonii* y *P. gingivalis*. Se sugirió que esta comunicación interespecies mediada por

AI-2 podría jugar un papel central en el procesamiento de carbohidratos y en la formación de biopelículas mixtas.

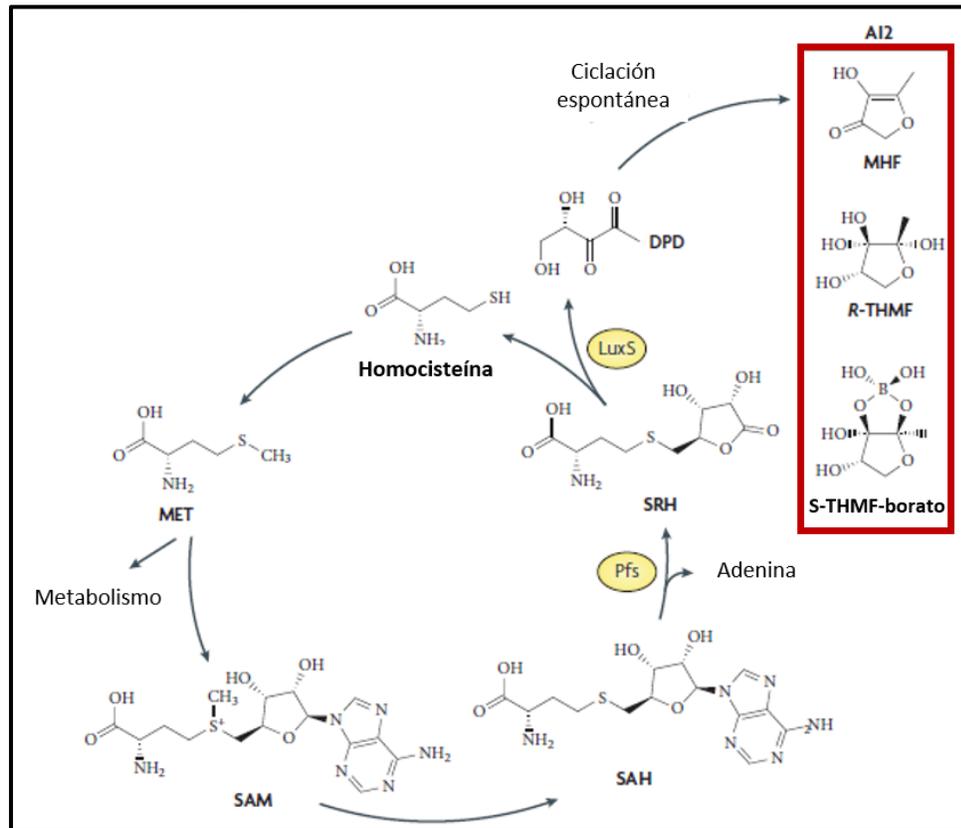


Figura 5. Ciclo Metilo Activado y síntesis de AI-2. A partir de Metionina (MET) se produce el donador de grupos metilos activados, denominado SAM (S-adenosil-metionina). Producto de una reacción esta molécula se convierte en SAH (S-adenosil-homocisteína), la cual mediante una nucleosidasa (Pfs) libera adenina y forma SRH (S-ribosil-homocisteína). Luego mediante la enzima LuxS se obtiene DPD y Homocisteína (que puede volver a entrar en la biosíntesis de MET *de novo*). DPD se somete a reacciones de ciclación espontánea para formar moléculas relacionadas estructuralmente que poseen actividad de AI-2, como MHF (4-hidroxi-5-metil-3 (2H) furanona), R-THMF ((2R,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano y S-THMF-borato (Furanosil Borato Diéster) (en cuadro rojo) (Modificado de Sun y cols., 2004; Hardie y Heurlier, 2008).

Originalmente, AI-2 fue descrito en el microorganismo marino *Vibrio harveyi*, controlando la expresión de luminiscencia (Bassler y cols., 1993), sin embargo, se ha encontrado que más de 50 especies bacterianas Gram positivo y Gram negativo producen AI-2 (Rickard y cols., 2006), además ha sido caracterizada como la molécula de señalización universal en la regulación de la formación de biopelículas multiespecies (revisado en Guo y cols., 2014). Más aún en la actualidad, se ha

descubierto que varias especies de la cavidad oral producen AI-2, incluyendo a *S. mutans*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Chung y cols., 2001; Merritt y cols., 2005, Rickard y cols., 2006; Cuadra-Saenz y cols., 2012; Wright y cols., 2013). De hecho, cepas de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. comensales intestinales poseen ortólogos del gen *luxS* y pueden producir AI-2 (De Keersmaecker y Vanderleyden, 2003; Sun y cols., 2004; Lebeer y cols., 2007b).

Algunos investigadores proponen a esta molécula de señalización como un modulador de la composición y dinámica de la comunidad microbiana, ya que en altas concentraciones podría asociarse a la transición desde una comunidad beneficiosa a una patogénica (Rickard y cols., 2006; Kolenbrander y cols., 2010).

Se ha establecido que la concentración de AI-2 es crítica en el mutualismo interespecies (Guo y cols., 2014). En el contexto de la cavidad oral, la acumulación de señal y la distancia a la cual se logra alcanzar el umbral mínimo requerido, pueden ser muy pequeñas. Cuando las bacterias están reunidas mediante co-agregación, la concentración umbral efectiva de AI-2 se puede alcanzar con una menor producción de esta molécula que cuando los microorganismos se encuentran más separados (Kolenbrander y cols., 2010).

Kolenbrander y cols. (2010), plantearon un modelo donde establecen que a medida que se incrementa la biomasa (menor distancia entre los distintos microorganismos) en la superficie del diente, la concentración local de AI-2 aumentaría, provocando que las especies patógenas inicien cambios en la expresión génica y las bacterias comensales podrían ser inhibidas a tales niveles de AI-2. El cepillado y el uso de seda dental eliminarían gran parte de la biomasa, por lo que disminuiría la concentración local de AI-2 y los microorganismos comensales dominarían nuevamente.

Rickard y cols. (2008), demostraron que AI-2 es importante en el mutualismo entre *S. oralis* y *Actinomyces oris*, además de ser capaz de promover el crecimiento y desarrollo de biopelículas duales entre estas especies. Estos autores también

proponen que las bajas concentraciones de AI-2 contribuirían al establecimiento de biopelículas comensales.

Como se indicó anteriormente, existen algunos estudios que describen la presencia de *quorum sensing* mediado por AI-2 en *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp.

Lebeer y cols. (2007a) analizaron la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* de *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), una cepa probiótica aislada desde microbiota intestinal humana sana, estableciendo que se ve condicionada por factores ambientales como el pH, osmolaridad, la presencia de bilis y mucinas. En otro estudio se demostró que la secuencia aminoacídica de LuxS de *L. rhamnosus* GG es 96% idéntica a LuxS de *L. casei* ATCC 334 y 80% a LuxS de *L. plantarum* WCFS1 (Lebeer y cols., 2007b). Además, establecieron que *L. rhamnosus* GG produce AI-2 a través de la enzima LuxS y que una mutación en el gen *luxS* afecta la capacidad de adhesión y formación de biopelículas monoespecies *in vitro* (Lebeer y cols., 2007b) e *in vivo* afecta la adhesión y supervivencia de esta especie en el aparato gastrointestinal de roedores (Lebeer y cols., 2008).

Moslehi-Jenbian y cols. (2009), evaluaron el efecto del estrés ácido sobre *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus johnsonii*, determinando que las 4 especies producen AI-2 y que al disminuir el pH del medio *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* aumentan significativamente la concentración de AI-2, sugiriendo que el sistema LuxS responde frente al estrés ácido en estos microorganismos. Asimismo, en otro estudio se comprobó que la cepa de *L. acidophilus* con una mutación del gen *luxS* no produce AI-2 y existe un descenso significativo en la adhesión *in vitro* de esta bacteria (Buck y cols., 2009).

Por otro lado, Sun y cols. (2014) analizaron la presencia del gen *luxS* en miembros del género *Bifidobacterium* gastrointestinales (*B. longum* NCC2705, *B. longum* E18 y *B. bifidum* S17), encontrando que poseían genes *luxS* cuyas proteínas LuxS codificadas eran de secuencia similar a la de *V. harveyi*. Junto con esto, determinaron que *B. longum* y *B. bifidum* presentan actividad AI-2 dependiente de LuxS. A su vez, en otra investigación se cocultivó *B. longum* NCIMB8809 y *B.*

breve NCIMB8807 para evaluar los cambios en la fisiología de ambas cepas al cultivarse juntas. En este ensayo, 16 proteínas cambiaron drásticamente su expresión en comparación con el monocultivo de cada especie, indicando que eran capaces de comunicarse entre ellas e influir en su fisiología (Ruiz y cols., 2009).

En el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral se comprobó que la cepa *B. dentium* ATCC 27534 es capaz de producir y secretar AI-2 funcional al medio externo, siendo esta molécula potenciadora de la adherencia y formación de biopelículas *in vitro* de *B. dentium* (García, 2017). Del mismo modo, se confirmó que la cepa *L. casei* ATCC 4646 también produce y secreta AI-2 funcional, favoreciendo su propia adhesión y formación de biopelículas *in vitro* (Villarroel, 2017).

Todos estos estudios muestran que tanto *L. casei* como *B. dentium* tendrían incorporado el sistema LuxS y serían capaces de producir AI-2 funcional, sin embargo, a la fecha no existen estudios sobre la comunicación interespecie entre estos microorganismos, la cual podría estar modulada mediante este sistema, teniendo un efecto sobre la adhesión y posterior formación de biopelículas. En base a todos estos antecedentes y a la coexistencia de estas especies en lesiones de caries profundas, se propone que *L. casei* y *B. dentium* serían capaces de establecer comunicación entre ellas. Esta comunicación sería a través de mecanismos de *quorum sensing*, específicamente mediado por la molécula de AI-2. Esta interacción podría concederles ventajas fisiológicas y promover su permanencia en las lesiones de caries, ya que el sistema LuxS se encuentra involucrado en procesos claves de colonización, como la adhesión y formación de biopelículas. En este estudio se analizó el efecto que posee *B. dentium* ATCC 27534 sobre estos procesos en la cepa de *L. casei* ATCC 4646, ambos microorganismos aislados desde lesiones de caries.

2. HIPÓTESIS

La molécula autoinductor-2 producida por *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 posee un efecto potenciador en la adherencia y formación de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de autoinductor-2 producido por *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 en la adhesión y formación de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar la presencia y funcionalidad de autoinductor-2 en el sobrenadante de *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534.
- b) Estudiar el efecto de *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 y su autoinductor-2 en la adhesión de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.
- c) Estudiar el efecto de *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 y su autoinductor-2 en la formación de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de Estudio Realizado

Este estudio se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT Nro. 11150928, cuyos protocolos se encuentran aprobados por el Comité Institucional de Bioseguridad (Anexo 1). Corresponde a un estudio de tipo experimental (analítico y prospectivo).

5.2 Cepas Bacterianas y Condiciones de Cultivo

Lactobacillus casei: Cepa obtenida de la American Type Culture Collection (*L. casei* ATCC® 4646™) aislada a partir de una lesión de caries dental. Se cultivó en medio sólido Mann Rogosa Sharpe (52 g/L MRS y 15 g/L Bacto™ Agar, pH 6,2, Oxoid, UK) y también en medio líquido (52 g/L MRS). Se cultivaron por diferentes tiempos dependiendo de los requisitos del experimento (mínimo durante 16 horas), en condiciones anaeróbicas utilizando sobres AnaeroPack–AnaeroMGC® a 37°C (Piwat y cols., 2010).

Bifidobacterium dentium: Cepa obtenida de la American Type Culture Collection (*B. dentium* ATCC® 27534™) aislada a partir de una lesión de caries dental. Se cultivó en placas de medio MRS suplementado con L-cisteína (MRSc) (52 g/L MRS, 15 g/L Bacto™ Agar, 0,5 g/L de L-cisteína, pH 6,2, Oxoid, UK) y en medio líquido MRSc (52 g/L MRS y 0,5 g/L de L-cisteína) por diferentes tiempos dependiendo de los requisitos del experimento, en condiciones anaeróbicas utilizando sobres AnaeroPack–AnaeroMGC® a 37°C (Sun y cols., 2014).

Vibrio harveyi: Cepa reportera obtenida de la ATCC (*V. harveyi* ATCC® BAA-1117™). Se cultivó en condiciones aeróbicas, en medio AB (Autoinducer Bioassay Medium) sólido (1,75% p/v NaCl, 1,23% p/v MgSO₄, 0,2% p/v Casaminoácidos, 10 mM K₃PO₄, 1 mM L-arginina, 1% v/v glicerol, 1,5% p/v agar) y líquido (1,75% p/v NaCl, 1,23% p/v MgSO₄, 0,2% p/v Casaminoácidos, 10 mM K₃PO₄, 1 mM L-arginina, 1% v/v glicerol, pH 7,5) a 30°C en condiciones estáticas, durante 16 horas (Bassler y cols., 1997; De Keersmaecker y Vanderleyden, 2003).

Para estandarizar todas las muestras, se controló el crecimiento bacteriano

midiendo la Densidad Óptica (D.O.) a 600 nm utilizando el Espectrofotómetro UV/Vis UNICAM UV2.

5.3 Procedimientos

5.3.1 Preparación sobrenadante de *B. dentium* ATCC 27534

El procedimiento para obtener el sobrenadante de los cultivos líquidos de *B. dentium* se llevó a cabo como describió Buck y cols. (2009). La cepa de *B. dentium* fue cultivada en medio MRS modificado con galactosa al 2% (MRSm: 10 g/L peptona, 8 g/L Lab-Lemco, 4 g/L extracto de levadura, 20 g/L D-galactosa, 0,1% v/v sorbitan mono-oleato, 2 g/L K₂HPO₄, 5 g/L CH₃COONa x 3H₂O, 2 g/L citrato de triamonio, 0,2 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 0,05 g/L MnSO₄ x 4H₂O) y suplementado con 0,5 g/L L-cisteína en condiciones anaeróbicas a 37°C por diferentes tiempos dependiendo de los requisitos del experimento (0, 2, 4, 6, 8 y 16 horas); corresponde a un medio modificado, ya que como establece Sun y cols. (2014) la glucosa produce un catabolito represor de la producción de luminiscencia por la cepa reportera *V. harveyi*.

Cada 2 horas, se colectaron alícuotas de 4 mL de cultivo y se midió la D.O.₆₀₀ para registrar el crecimiento en 6 tiempos diferentes. Luego, mediante centrifugación (Universal 320R HETTICH®, 7.690 g durante 6 minutos a 4°C) se obtuvieron los sobrenadantes libres de células y se neutralizó el pH de cada uno con NaOH estéril (medido con pHmetro), ya que *V. harveyi* no es viable en el medio ácido producido por *B. dentium* (Sun y cols., 2014). Posterior a esto, los sobrenadantes se esterilizaron mediante filtros de membrana con tamaño de poro 0,22 µm (Syringe Filter, BIOFIL®) y fueron refrigerados a -20°C hasta su uso.

5.3.2 Detección de AI-2 producido por *B. dentium* ATCC 27534

La presencia y actividad de AI-2 se detectó utilizando la cepa reportera *Vibrio harveyi* BB170, la cual produce luminiscencia en presencia de esta molécula (De Keersmaecker y Vanderleyden, 2003; Taga y Xavier, 2011).

Se cultivó la cepa reportera durante 16 horas a 30°C en medio AB líquido. Posteriormente, se realizó un lavado de las células mediante centrifugación (6.080

g durante 10 minutos a 4°C) y resuspensión en medio AB fresco a una D.O.₆₀₀ de 0,5 y finalmente los cultivos fueron diluidos en una proporción de 1/1.000 en medio AB (Buck y cols., 2009).

El sobrenadante de *B. dentium* libre de células y estéril (centrifugado, neutralizado con NaOH y filtrado) obtenido en 6 tiempos distintos, se mezcló con *V. harveyi* en proporción 1:9, respectivamente, en una placa de poliestireno de 96 pocillos negra (Cell Culture Plate, NUNC®) (De Keersmaecker y Vanderleyden, 2003). La luminiscencia se midió cada 5 minutos durante 6 horas en el lector de placas Synergy HT BIOTEK®, el cual se encontraba a 30°C. Se cuantificó la actividad de AI-2 como Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L.) (Sun y cols., 2014).

Se consideraron los siguientes controles (Tabla 1):

Tabla 1. Controles considerados en el ensayo de luminiscencia de *V. harveyi*.

CONTROL	RELACIÓN 9:1
Blanco	Medio AB + Medio MRSm
Negativo	<i>V. harveyi</i> en medio AB + Medio MRSm
Positivo	<i>V. harveyi</i> en medio AB + AI-2 sintetizado químicamente (5 µM) en medio MRSm

El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose el promedio y desviación estándar en cada caso.

5.3.3 Obtención y preparación de saliva humana

Para los ensayos de adhesión y formación de biopelículas se requirió de una muestra de saliva humana no estimulada como medio de suspensión, la cual fue preparada como lo describe Cuadra-Saenz y cols. (2012). Este protocolo se encuentra aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 2).

La saliva se recolectó de cinco donantes adultos sanos (sin enfermedades sistémicas, sin enfermedad de caries ni enfermedad periodontal, no fumadores, sin consumo de medicamentos al momento de la recolección y no hayan recibido aplicación de flúor en el último mes). Se solicitó a los donantes no consumir ningún alimento o bebida ni haberse cepillado los dientes durante las 2 horas previas a la recolección de saliva. Se obtuvo el Consentimiento Informado de cada donante (Anexo 3). El examen clínico y la recolección de muestras fueron realizados por un Cirujano Dentista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en el servicio de diagnóstico de la Clínica Odontológica.

Se recolectaron aproximadamente 10 mL de saliva de cada donante, en tubos cónicos estériles y se mantuvieron a 4°C durante aproximadamente 10 minutos hasta su procesamiento en el laboratorio. Las muestras de los donantes fueron mezcladas entre sí y se añadió DTT (Ditiotreitol) a una concentración final de 2,5 mM. La mezcla obtenida fue centrifugada a 14.000 g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante se almacenó a -20°C. Cuando fue requerida la muestra de saliva-DTT, esta se llevó a temperatura ambiente para luego ser esterilizada mediante un filtro de membrana con tamaño de poro 0,22 µm (Syringe Filter, BIOFIL®).

5.3.4 Ensayos de adherencia de *L. casei* ATCC 4646

Se determinó la adhesión bacteriana de *L. casei* ATCC 4646 durante la formación inicial de la biopelícula, después de 22 horas de incubación, como describe He y cols. (2015). El cultivo líquido de *L. casei*, fue centrifugado (6.080 g durante 10 minutos a 4°C), para luego eliminar el sobrenadante, lavarlo y resuspenderlo en tampón PBS estéril (Phosphate Buffered Saline, 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, pH 7,4), dejando el cultivo a una D.O.₆₀₀ final de 1,0. El cultivo de *L. casei* resuspendido fue inoculado en placas de poliestireno de 96 pocillos transparente (Orange Scientific®), utilizando como medio 20 µL de saliva.

Para analizar el efecto de AI-2 y del sobrenadante de cultivo de *B. dentium* ATCC 27534 (obtenido en la sección 5.3.1) en la adherencia de *L. casei*, se

conformaron los siguientes grupos experimentales, tal como se muestra en la Figura 6.

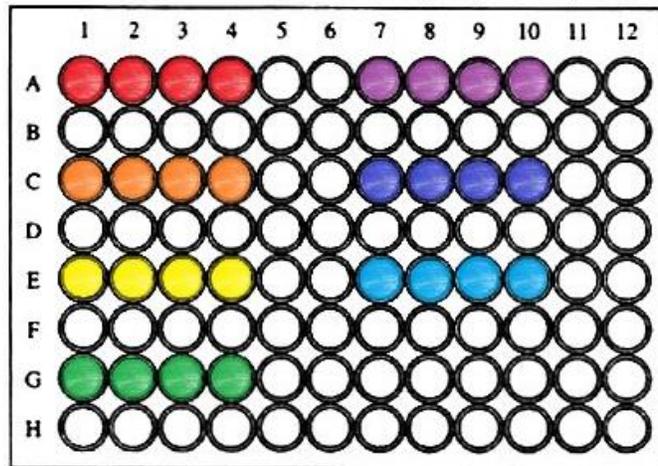


Figura 6. Esquema de grupos experimentales por cuadruplicado para el ensayo de adhesión.

- a) Rojo (blanco experimental):** 20 μ L saliva + 70 μ L MRS + 10 μ L PBS.
- b) Naranja:** 20 μ L saliva + 70 μ L MRS + 10 μ L *L. casei* en PBS.
- c) Amarillo:** 20 μ L saliva + 60 μ L MRS + 10 μ L *L. casei* en PBS + 10 μ L sobrenadante de *L. casei*.
- d) Verde:** 20 μ L saliva + 60 μ L MRS + 10 μ L *L. casei* en PBS + 10 μ L sobrenadante de *B. dentium* (tiempo final).
- e) Morado:** 20 μ L saliva + 60 μ L MRS + 10 μ L *L. casei* en PBS + 10 μ L DPD 10 μ M.
- f) Azul:** 20 μ L saliva + 60 μ L MRS + 10 μ L *L. casei* en PBS + 10 μ L DPD 100 μ M.
- g) Celeste:** 20 μ L saliva + 60 μ L MRS + 10 μ L *L. casei* en PBS + 10 μ L DPD 1000 μ M.

Como se puede observar, solo se utilizó el sobrenadante final de *B. dentium*, ya que, según los resultados obtenidos en el ensayo de luminiscencia, este último presentaba mayor cantidad de AI-2 en comparación con los 5 tiempos anteriores. También se obtuvieron 3 grupos experimentales a los cuales se les añadió DPD sintetizado químicamente (OMM Scientific), que se interconvierte espontáneamente a AI-2, a distintas concentraciones finales 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M (Lebeer y cols., 2007b).

Las placas se incubaron a 37°C en anaerobiosis durante 22 horas sin agitación para esperar la adherencia bacteriana a los pocillos.

Luego de la incubación, el medio fue desechado y cada pocillo se lavó cuidadosamente tres veces con 100 µL de PBS estéril para eliminar las células no adheridas. Posteriormente, se agregó a cada pocillo 65 µL de PBS y 30 µL de MRS. Para determinar la adhesión bacteriana se utilizó el ensayo MTT según las instrucciones del fabricante, agregando a los pocillos 5 µL del reactivo MTT amarillo [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoilo] (Cell Proliferation Kit, Sigma®). Nuevamente las placas fueron incubadas, durante 3 horas en condiciones anaeróbicas a 37°C. Pasado este tiempo se formaron cristales de sal púrpura los que son insolubles en solución acuosa, por lo que se agregó el reactivo solubilizante (10% SDS en 0,01M HCl) para resuspender el precipitado del reactivo MTT y finalmente incubarlos toda la noche a 37°C (He y cols., 2015).

Finalmente, se cuantificaron los resultados midiendo la D.O.₅₅₀ en el lector de placas Synergy HT (Biotek®).

5.3.5 Formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646

El análisis de formación de biopelículas se llevó a cabo como lo describe Lebeer y cols. (2007b) con ciertas modificaciones. Se cultivó *L. casei* a 37°C en condiciones anaeróbicas durante 24 horas. El cultivo líquido de *L. casei* fue centrifugado (6.080 g durante 10 minutos a 21°C), para posteriormente desechar el sobrenadante, ser lavado y resuspendido en PBS a una D.O.₆₀₀ de 0,6.

Paralelamente, se preincubaron 6 cubreobjetos circulares pequeños cubiertos por completo con la muestra de saliva-DTT a temperatura ambiente por 3 horas en agitación orbital, para permitir la adhesión de las proteínas salivales a la superficie de los cubreobjetos de vidrio. Pasado este tiempo, los 6 cubreobjetos fueron colocados en una placa de poliestireno de 24 pocillos (Corning Inc, COSTAR® 3524), donde se formaron los siguientes grupos experimentales:

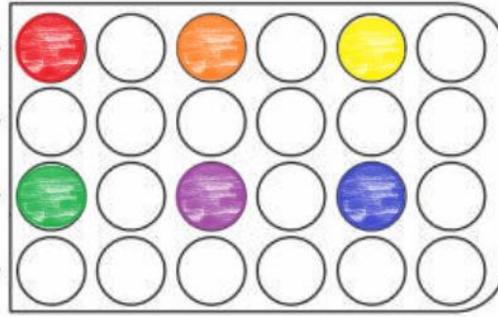


Figura 7. Esquema de grupos experimentales para ensayo de formación de biopelículas.

- a) Rojo:** 350 μ L MRS + 50 μ L PBS + 100 μ L saliva.
- b) Naranja:** 350 μ L MRS + 50 μ L *L. casei* en PBS + 100 μ L saliva.
- c) Amarillo:** 300 μ L MRS + 50 μ L *L. casei* en PBS + 50 μ L sobrenadante de *L. casei* + 100 μ L saliva.
- d) Verde:** 300 μ L MRS + 50 μ L *L. casei* en PBS + 50 μ L sobrenadante de *B. dentium* (tiempo final) + 100 μ L saliva.
- e) Morado:** 300 μ L MRS + 50 μ L *L. casei* en PBS + 50 μ L DPD 10 μ M + 100 μ L saliva.
- f) Azul:** 300 μ L MRS + 50 μ L *L. casei* en PBS + 50 μ L DPD 100 μ M + 100 μ L saliva.

Al igual que en el ensayo de adherencia solo se utilizó el sobrenadante final de *B. dentium*, ya que, según los resultados del ensayo de luminiscencia, este último era el que presentaba mayor cantidad de AI-2. Dos de los grupos experimentales fueron inoculados con AI-2 sintetizado químicamente (OMM Scientific) a concentraciones finales de 1 μ M y 10 μ M.

La placa de 24 pocillos se dejó incubar a 37°C en anaerobiosis, en condiciones estáticas, durante 6 días para esperar la formación de biopelícula de *L. casei*.

Luego de la incubación se retiró el sobrenadante de los pocillos dejando únicamente los cubreobjetos en el fondo, para agregar 500 μ L de PBS estéril a cada uno y agitar la placa orbitalmente en una Agitadora Orbital (3D Sunflower Mini-Shaker, BIOSAN®), repitiendo este procedimiento dos veces. Posteriormente se

retiraron los 6 cubreobjetos, dejándolos en Glutaraldehído al 2,5% p/v (fijador de muestras) en agitación orbital durante 2 horas.

Finalmente, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y se analizaron en el microscopio JEOL modelo JSM-IT300LV. Las imágenes obtenidas fueron analizadas de forma descriptiva.

5.3.6 Análisis Estadísticos

El ensayo de luminiscencia fue realizado por triplicado, mientras que el ensayo de adhesión se llevó a cabo múltiples veces, pero el último análisis es el que se presenta en este estudio y fue realizado por cuadruplicado. Se establecieron los promedios de cada resultado con sus respectivas desviaciones estándar. Para evaluar si existió diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes análisis, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Como los datos no presentaron distribución paramétrica, se utilizó la prueba de Mann-Whitney mediante el programa GraphPad Prism 7.05, para la comparación de dos muestras independientes, considerando como hipótesis nula (H_0) que las medianas de las dos muestras son iguales. Se rechaza la hipótesis nula con valores de $p \leq 0,05$.

El ensayo de formación de biopelículas al ser analizado descriptivamente solo se realizó una vez.

6. RESULTADOS

6.1 Crecimiento de *B. dentium* ATCC 27534

Se realizó una curva de crecimiento de *B. dentium* ATCC 27534 con la finalidad de caracterizar su desarrollo previo a la detección de AI-2, obteniéndose el gráfico presentado en la Figura 8, en el cual se observa que a las 16 horas de crecimiento ya se había alcanzado la fase estacionaria.

En Figura 8, se observa la velocidad de crecimiento de cada etapa, expresada como el aumento de unidades de absorbancia/horas de incubación. Inicialmente se distingue una fase de latencia, adaptación y crecimiento lento, donde la velocidad de crecimiento es de 0,0531/h (A). Luego, se alcanza la fase de crecimiento exponencial que se prolonga hasta las 8 horas y posee una velocidad de 0,2375/h (B). Finalmente se observa la fase estacionaria, donde la velocidad de crecimiento disminuye drásticamente a 0,0357/h (C).

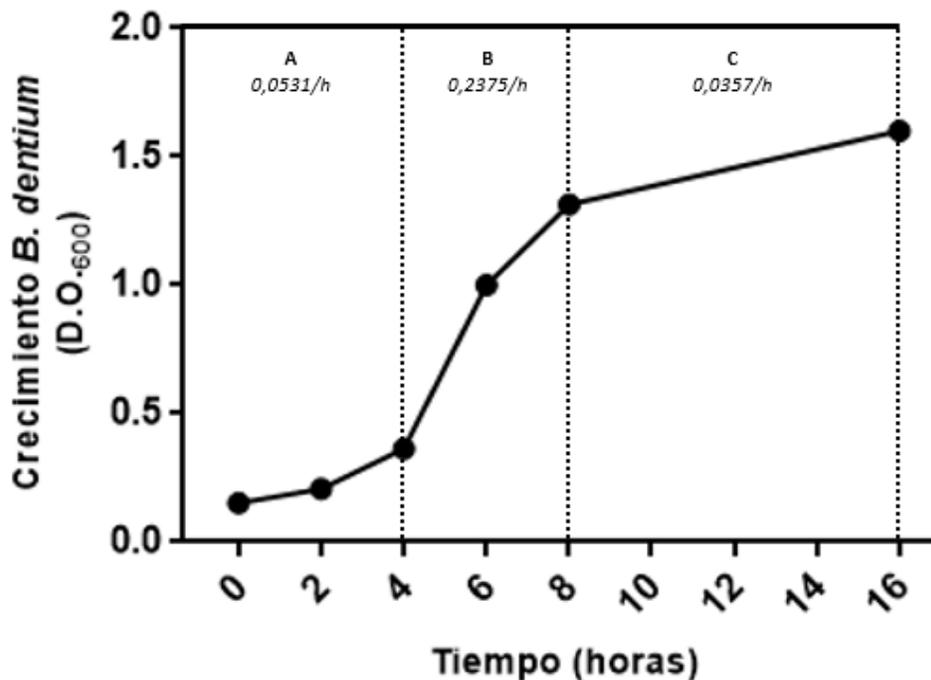


Figura 8. Curva de crecimiento de *B. dentium* ATCC 27534. Velocidades de crecimiento en la fase de latencia (A), fase logarítmica (B) y fase estacionaria (C). Tiempos de crecimiento: 0, 2, 4, 6, 8 y 16 horas.

6.2 Presencia y funcionalidad de AI-2 proveniente de *B. dentium* ATCC 27534

Con el objetivo de medir la producción de AI-2 en las diferentes etapas de crecimiento de *B. dentium* ATCC 27534, se analizó la presencia de AI-2 en los sobrenadantes libres de células de *B. dentium*.

Se cuantificó la actividad de AI-2 como Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L.) (Figura 9). En todos los sobrenadantes de cultivo es posible detectar AI-2, sin embargo, a las 0, 2, 4 y 6 horas de crecimiento fueron niveles muy bajos. Por otro lado, a las 8 y 16 horas de crecimiento se obtuvieron cantidades significativas de AI-2 con respecto al control negativo, donde no existe estímulo ($p=0,0022$, para ambos grupos experimentales). El control positivo, que posee AI-2 sintetizado químicamente, también presentó cantidades significativas de luminiscencia con respecto al control negativo ($p=0,0022$).

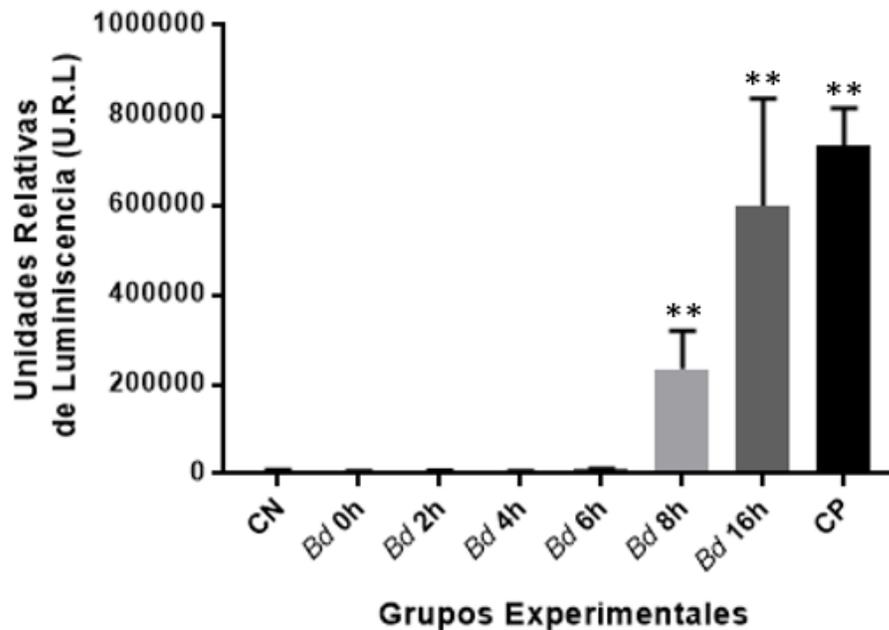


Figura 9. Cuantificación de luminiscencia producida por *V. harveyi* ATCC BAA-1117 al ser expuesto a los sobrenadantes de *B. dentium* ATCC 27534 (*Bd*) en distintos tiempos de crecimiento (0, 2, 4, 6, 8 y 16 horas). CN: control negativo, CP: control positivo. Promedio +/- desviación estándar. Mann-Whitney, ** $p \leq 0,01$.

Además, se correlacionó la producción de AI-2 obtenida en los distintos sobrenadantes con las etapas de crecimiento de *B. dentium*. Se percibió mayores

niveles de AI-2 a las 8 y 16 horas, correspondientes a la fase estacionaria de crecimiento de *B. dentium* (Figura 10).

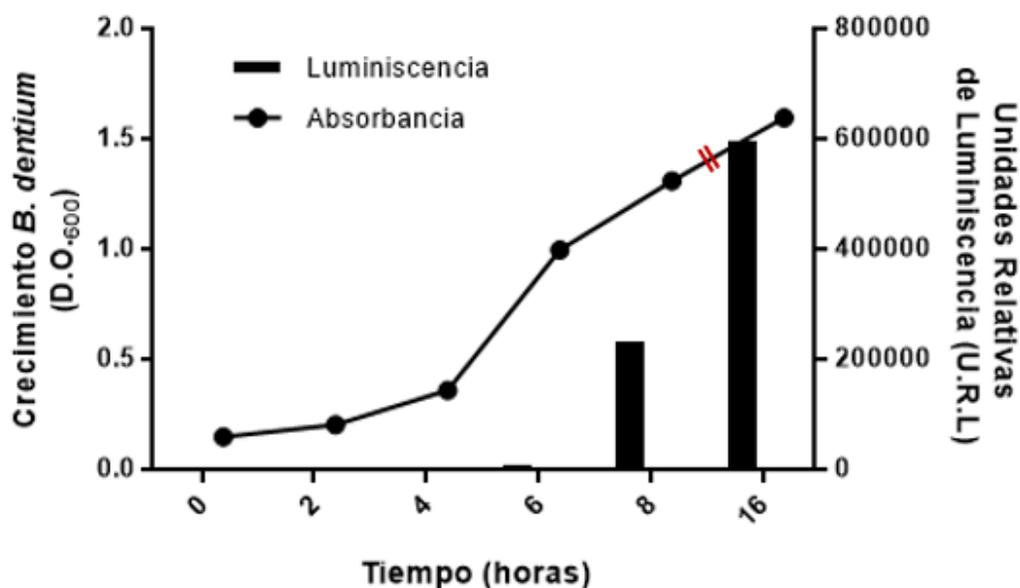


Figura 10. Correlación entre la producción de AI-2 y las fases de crecimiento de *B. dentium*. Tiempos de crecimiento: 0, 2, 4, 6, 8, 16 horas. Curva de crecimiento desde las 8 a las 16 horas no se encuentra a escala.

6.3 Efecto de *B. dentium* ATCC 27534 en la adhesión de *L. casei* ATCC 4646

Para determinar el efecto de *B. dentium* ATCC 27534 en la adhesión *in vitro* de *L. casei* ATCC 4646, ésta se analizó en presencia y ausencia del sobrenadante (SN) final de *B. dentium* (16 horas) que contiene AI-2, de acuerdo con los resultados presentados en la sección 6.2. Además, se estudió el efecto del sobrenadante de la misma cepa de *L. casei*, positivo para la presencia de AI-2 mediante el ensayo con la cepa reportera *V. harveyi* (dato no mostrado).

Mediante el ensayo MTT se observó cualitativamente la capacidad de adhesión de este microorganismo, según la intensidad de color de cada grupo experimental como se observa en la Figura 11. A mayor intensidad, mayor cantidad de células viables adheridas al pocillo de la placa de poliestireno, ya que el reactivo solo es internalizado y transformado en Formazán por células viables.

Se puede establecer que el blanco (Figura 11A), no presenta coloración púrpura pues no existen células adheridas; mientras que los demás pocillos si poseen una tonalidad púrpura, con diferencia en intensidad.

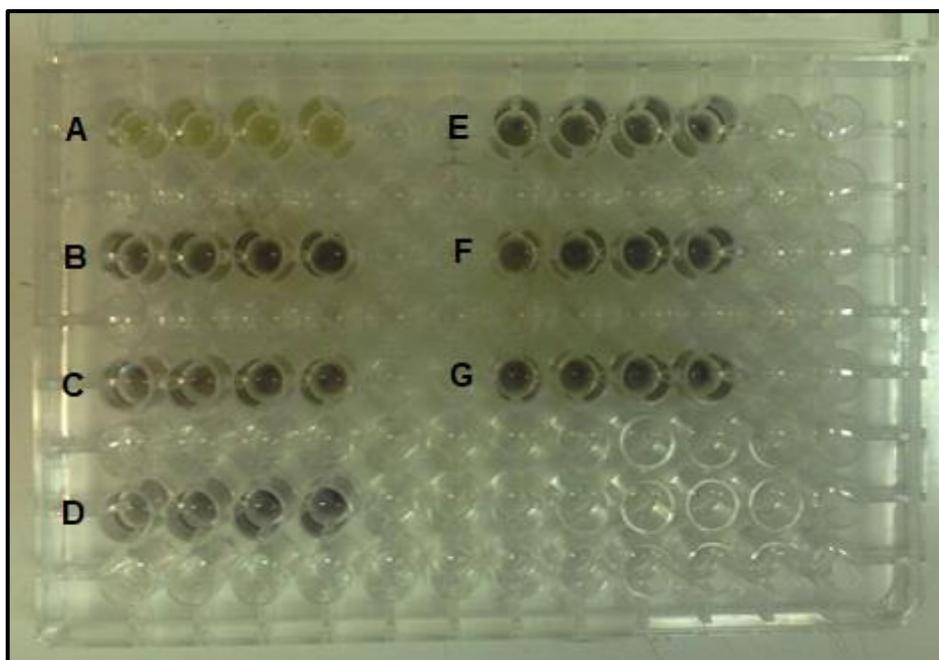


Figura 11. Fotografía del resultado cualitativo del ensayo de adherencia. La intensidad de color de los diferentes grupos experimentales es directamente proporcional a la cantidad de células adheridas a la superficie. (A) Blanco; (B) *L. casei*; (C) *L. casei* + SN *L. casei*; (D) *L. casei* + SN final *B. dentium*; (E) *L. casei* + DPD 10 μ M; (F) *L. casei* + DPD 100 μ M; (G) *L. casei* + DPD 1000 μ M.

Los resultados cuantitativos del ensayo de adherencia se presentan en la Figura 12, donde se observa una mayor adhesión en el grupo experimental con DPD a concentración final de 1 μ M, seguido por el grupo con DPD a concentración final de 10 μ M y por el grupo con el SN de *B. dentium*, todos ellos presentan una diferencia estadísticamente significativa al compararlos con la condición experimental de adhesión de *L. casei* sin estímulo ($p=0,0286$, para los tres grupos experimentales). Una menor adhesión se observó en el grupo que posee DPD a una concentración final de 100 μ M ($p=0,0286$) y en aquel grupo que posee el SN de *L. casei* no se observó una diferencia estadísticamente significativa.

Se puede observar una menor adhesión en el grupo que posee el SN de *L. casei* comparado con el grupo que posee el SN de *B. dentium*, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. El efecto del sobrenadante de *B.*

dentium sobre la adhesión *in vitro* de *L. casei* ATCC 4646 sería similar al efecto observado al utilizar DPD 10 μ M final.

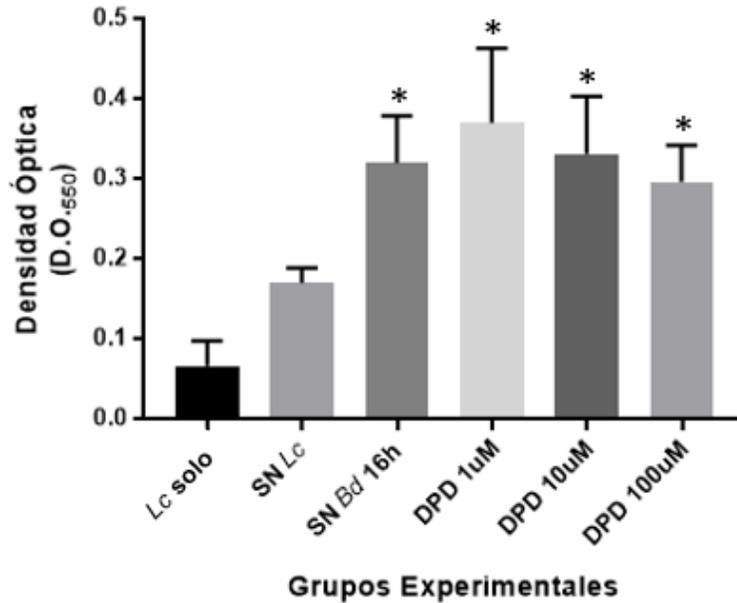


Figura 12. Cuantificación de la absorbancia (Densidad Óptica) obtenido del análisis de adherencia de *L. casei* ATCC 4646 *in vitro*. Lc: *L. casei*, SN Lc: sobrenadante *L. casei*, SN Bd 16h: sobrenadante de *B. dentium* a las 16 horas. Promedio +/- desviación estándar. Mann-Whitney, * $p \leq 0,05$.

6.4 Efecto de *B. dentium* ATCC 27534 en la formación inicial de biopelícula de *L. casei* ATCC 4646

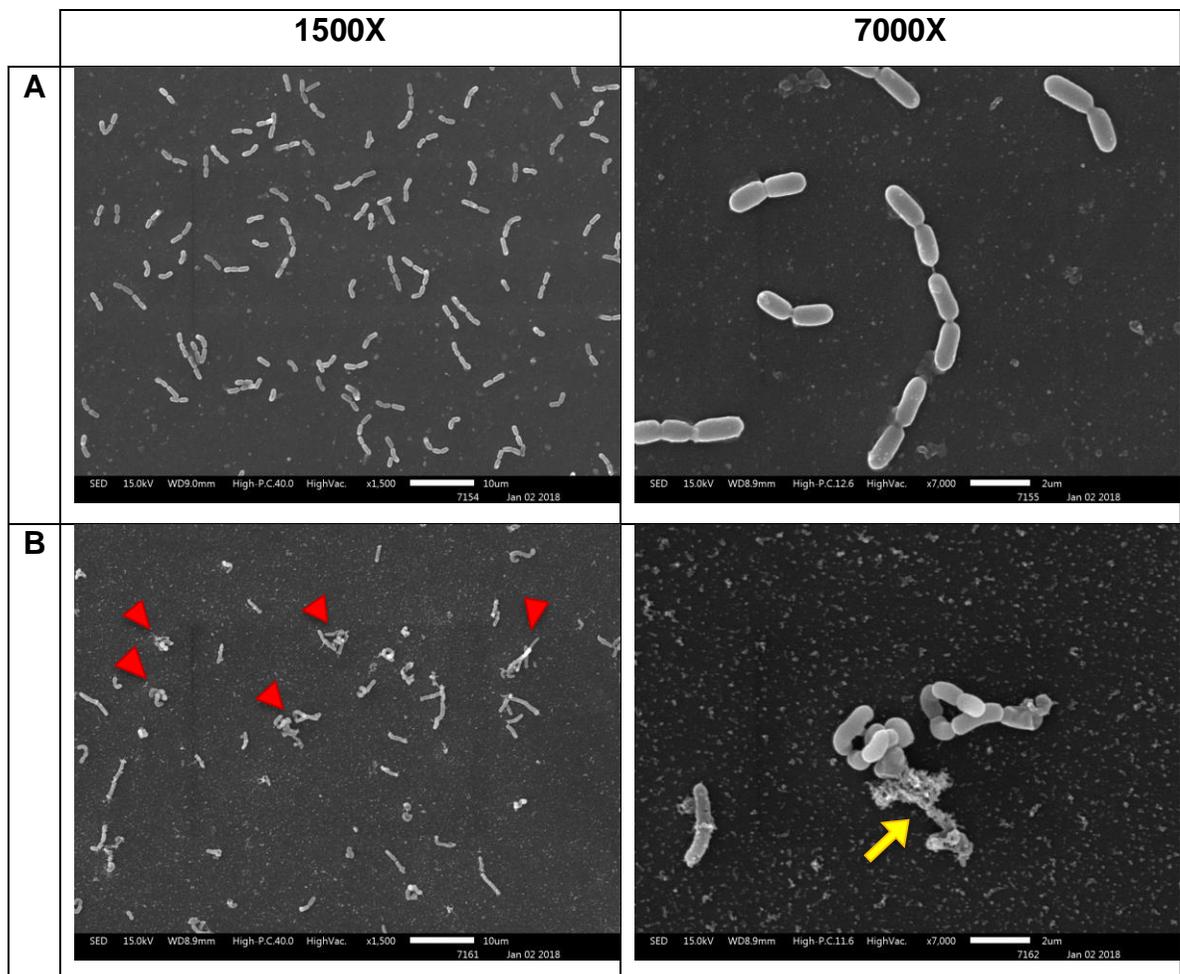
Con la finalidad de determinar el efecto que produce AI-2 en la formación inicial de biopelícula *in vitro* de *L. casei* ATCC 4646, se analizó en presencia y ausencia de sobrenadante final de *B. dentium* que contiene AI-2 (sección 6.2). Además, se estudió el efecto del sobrenadante de la misma cepa de *L. casei*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

En ausencia del estímulo se observan las bacterias de *L. casei* adheridas a la superficie, pero sin formar conglomerados entre ellas (Figura 13A). En las imágenes de *L. casei* con su propio sobrenadante se pueden apreciar pequeños conglomerados bacterianos y la presencia de exopolisacáridos (Figura 13B). Sin embargo, en la fotomicrografía de *L. casei* con el sobrenadante final de *B. dentium*,

se aprecia cualitativamente mayor agregación bacteriana y mayor producción de exopolisacáridos (Figura 13C), en comparación a las imágenes anteriores.

Por otro lado, al adicionar DPD sintetizado químicamente se distinguen conglomerados bacterianos de mayor tamaño, siendo más grandes a una concentración final de 10 μM (Figura 13E) que a 1 μM (Figura 13D). Conjuntamente, se aprecia un leve incremento en la formación de matriz extracelular, posiblemente exopolisacáridos, lo cual se percibe como una sustancia amorfa adherida a las bacterias.

Es posible observar, en todos los casos, que *L. casei* mantiene su morfología característica de bastón, indicando que la molécula de AI-2 incorporada exógenamente, no tendría efectos negativos sobre el tamaño, crecimiento y/o división celular de *L. casei*.



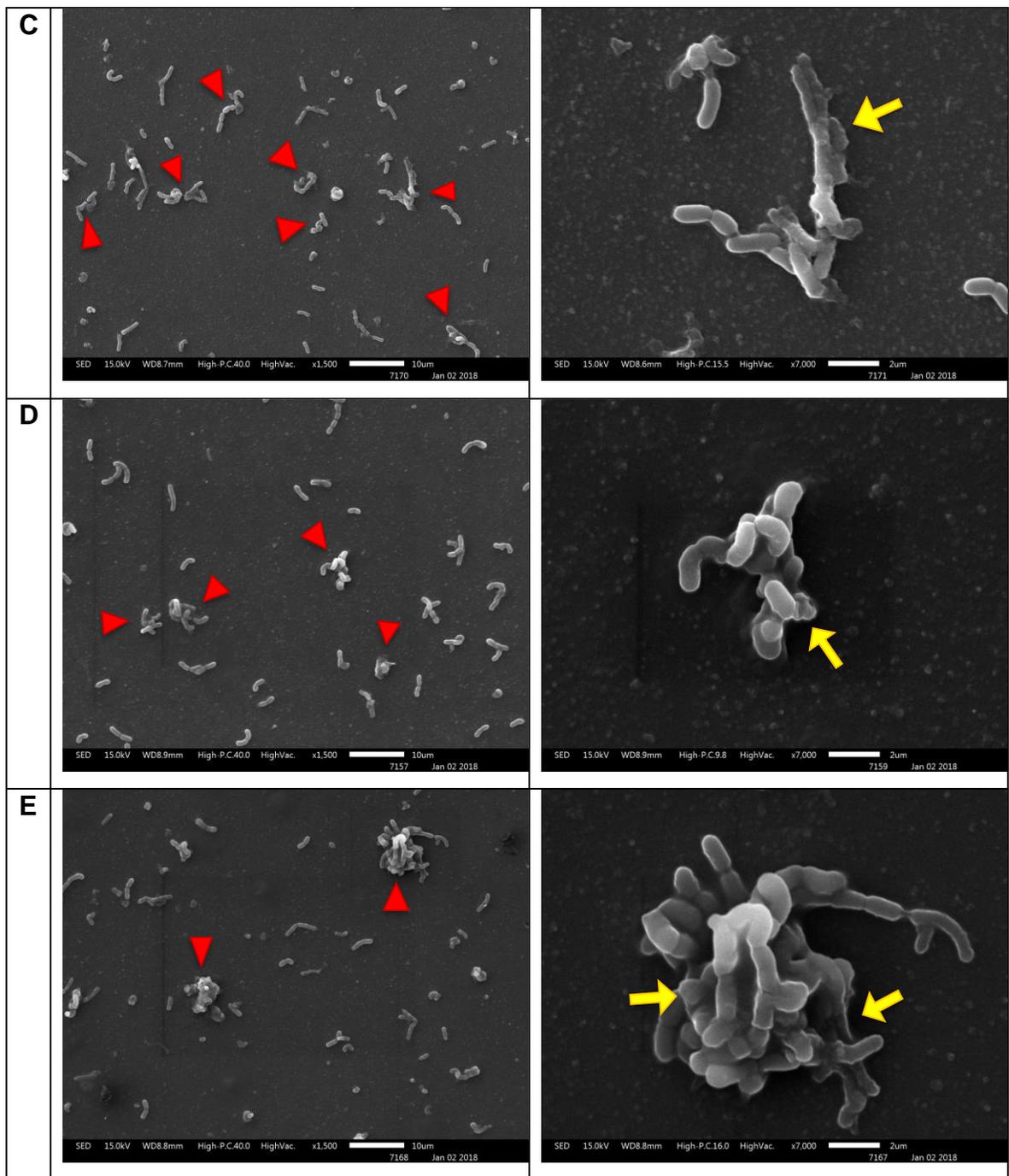


Figura 13. Fotomicrografía por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de *L. casei* ATCC 4646 sobre discos de vidrio embebidos previamente con saliva a los 6 días de incubación. Magnificación 1500X (columna izquierda) y 7000X (columna derecha). (A) *L. casei*; (B) *L. casei* + SN *L. casei*; (C) *L. casei* + SN final *B. dentium*; (D) *L. casei* + DPD a 10 μ M; (E) *L. casei* + DPD a 100 μ M. Punta de flecha roja: conglomerados bacterianos; Flecha amarilla: posibles exopolisacáridos

7. DISCUSIÓN

A medida que aumenta la profundidad de la lesión de caries, disminuye la diversidad microbiana, puesto que se genera un ambiente de condiciones más extremas (Kianoush y cols., 2014) condicionando la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota presente (Marsh y cols., 2003; Kianoush y cols., 2014). Por esta razón, en el frente de avance de una lesión, *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. son parte de las especies más frecuentes (Chhour y cols., 2005; Beighton y cols., 2008; Klinke y cols., 2009; Mantzourani y cols., 2009a). Se ha determinado que algunas especies, pertenecientes a estos géneros, presentan un sistema de comunicación celular denominado *quorum sensing*, el cual mediante AI-2 dependiente de LuxS, coordinaría diversos comportamientos en respuesta a entornos variables (Lebeer y cols., 2007b; Hojo y cols., 2009; Ng y Bassler, 2009; Sun y cols., 2014).

Hasta la fecha, no existen reportes sobre el efecto que posee *B. dentium* al interactuar con *L. casei* a través de *quorum sensing* mediado por la molécula de señalización celular, AI-2. En este estudio se determinó que AI-2 posee un efecto potenciador en la adhesión y posterior formación de biopelícula monoespecie *in vitro* de la cepa *L. casei* ATCC 4646, así como los sobrenadantes de cultivo de *B. dentium* ATCC 27534 que poseían elevados niveles de esta molécula. Esto permite sugerir que AI-2 en los sobrenadantes de *B. dentium* podría ser responsable de este efecto potenciador, y que, por ende, la hipótesis planteada se confirma.

En un estudio previo en el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral se determinó que la cepa *B. dentium* ATCC 27534 es capaz de producir y secretar AI-2 al medio externo (García, 2017). En la presente investigación, se confirma que la cepa *B. dentium* ATCC 27534 posee el sistema de *quorum sensing* mediado por la vía LuxS/AI-2 funcional. Lo mismo fue descrito para *B. longum* NCC2705, donde la sobreexpresión del gen *luxS*, aumenta los niveles de AI-2 en los sobrenadantes del cultivo de esta cepa. Adicionalmente, se reportó que todas las secuencias genómicas disponibles de *Bifidobacterium* spp. portan genes *luxS* putativos (Sun y cols., 2014).

Primero, para determinar si *B. dentium* ATCC 27534 es capaz de producir AI-2 y a la vez determinar los niveles de esta molécula en las distintas fases de crecimiento del microorganismo, se obtuvieron 6 sobrenadantes libres de células de *B. dentium*. Estos fueron incubados con la cepa reportera *V. harveyi* ATCC BAA-1117, la cual produce bioluminiscencia como respuesta a la detección de AI-2 funcional en el medio externo (De Keersmaecker y Vanderleyden, 2003; Taga y Xavier, 2011). La producción significativamente mayor de AI-2 se dio con el sobrenadante de 16 horas de cultivo de *B. dentium*, es decir, en la fase estacionaria de crecimiento (Figura 10). Es por esto, que para los ensayos de adherencia y formación inicial de biopelícula de *L. casei* se utilizó el sobrenadante final (16 horas). Esto se condice con un estudio que evaluó el efecto de las fases de crecimiento de *B. longum* BBMN68 en la secreción de AI-2, siendo la concentración más alta de AI-2 al inicio de la fase estacionaria (12 horas de cultivo), para luego decaer a la mitad en la fase estacionaria tardía (24 horas de cultivo) (Song y cols., 2018).

V. harveyi posee dos moléculas de señalización que controlan la bioluminiscencia, AI-1 y AI-2. Sin embargo, en la cepa BB170 se encuentra mutado el sensor para AI-1, por lo cual responde únicamente a la señal de AI-2 (Bassler y cols., 1993). Además, esta cepa es sensible a bajas cantidades de esta molécula y su mayor secreción de AI-2 ocurre en la fase estacionaria, es decir, en una alta densidad celular (Bassler y cols., 1997; Taga y Xavier, 2011). Cuando se agrega AI-2 exógeno (por ejemplo, sobrenadantes de *B. dentium* y DPD) se induce la producción de luz antes de que exista una autoinducción por parte de *V. harveyi* (Bassler y cols., 1993), puesto que la producción endógena de AI-2 durante las primeras 5 horas de inoculación es mínima (De Keersmaecker y Vanderleyden, 2003). Por lo tanto, como *V. harveyi* se cultivó durante 6 horas, es el tiempo adecuado para monitorear el efecto de AI-2 exógeno, concluyendo que la cantidad detectada en los sobrenadantes es producida exclusivamente por la cepa *B. dentium*. Cabe señalar que la metodología utilizada en este estudio permite detectar la presencia de AI-2, pero no establecer la tasa de producción de esta molécula.

Algunas limitaciones presentes en el ensayo de bioluminiscencia que pueden afectar la actividad AI-2, es el pH ácido de los sobrenadantes, los cuales, al ser neutralizados previamente, restauran la detección de la molécula a través de la cepa

reportera, pero no completamente (Sun y cols., 2014). Es por esto, que mediante este ensayo se puede observar tendencias generales cualitativas, pero no permitiría análisis cuantitativos de AI-2 (Turovskiy y Chikindas, 2016). Otro elemento que podría afectar los resultados, tal como lo describe De Keersmaecker y Vanderleyden (2003), es la suplementación del sobrenadante libre de células con ácido bórico, el cual aumentaría la inducción de luminiscencia por parte de *V. harveyi*, puesto que la forma activa de AI-2 más común en el ambiente natural marino de este microorganismo es la forma boratada (S-THMF-borato o Furanosil Borato Diéster). Probablemente la molécula de AI-2 secretada por *B. dentium* en este estudio, sea la forma no boratada (R-THMF), ya que en ambientes terrestres el boro es limitado (Ng y Bassler, 2009); por tanto, para detectar niveles bajos de AI-2, sería de utilidad agregar ácido bórico a los sobrenadantes para que, mediante ciclaciones espontáneas, esta molécula incorpore boro y aumente la sensibilidad del ensayo.

La formación de biopelículas es un proceso que consta de ciertas etapas, siendo la primera de estas la adhesión a la superficie dentaria, seguido por la acumulación bacteriana mediante adherencia intra e interespecies y posterior maduración de la biopelícula (Hojo y cols., 2009; He y cols., 2015). Es por esto, que el primer ensayo ejecutado en este estudio fue la adhesión *in vitro* de *L. casei*.

Considerando que *B. dentium* produce mayor AI-2 funcional a las 16 horas de cultivo, se procedió a determinar si este sobrenadante era capaz de potenciar la adhesión a superficie de *L. casei* ATCC 4646. Para cuantificar la adhesión se utilizó el ensayo MTT. Este ensayo colorimétrico tiene como objetivo la cuantificación espectrofotométrica de la proliferación y viabilidad celular, logrando así discriminar entre bacterias viables adheridas y aquellas bacterias muertas residuales. Si bien, *L. casei* fue capaz de adherirse *in vitro*, se determinó que la mayor adhesión celular ocurrió en presencia de DPD 1 μ M ($p=0,0286$), seguido por DPD 10 μ M ($p=0,0286$) y por el sobrenadante de cultivo de *B. dentium* de 16 horas ($p=0,0286$) (Figura 12).

El propósito de incluir un grupo experimental del medio condicionado de *L. casei*, fue identificar si existen compuestos secretados por este microorganismo que puedan influir en su propia adhesión. En un estudio previo, se identificó que *L. casei* ATCC 4646 es capaz de secretar AI-2 al medio externo e influir positivamente en su

adherencia *in vitro* (Villarreal, 2017), por lo tanto, los resultados de la presente investigación son consistentes con este estudio, encontrándose que existe una adherencia mayor comparada a *L. casei* sin estímulo, pero sin ser estadísticamente significativa.

Se podría establecer que la respuesta percibida en *L. casei* es dependiente de la concentración de AI-2, ya que la adhesión es mayor a una concentración de 1 μ M de DPD y decrece al aumentar ésta (10 μ M y 100 μ M). Esto se condice con lo planteado por otros autores, quienes definen esta molécula como una señal de concentración dependiente y establecieron una concentración óptima de AI-2 para que existiera un sistema de comunicación entre *S. oralis* - *A. oris* (Rickard y cols., 2006) y *S. gordonii* - *S. oralis* (Cuadra-Saenz y cols., 2012) en la estructura y composición de biopelículas duales.

Por otra parte, se analizó el efecto de AI-2 en el tracto gastrointestinal, estableciendo que esta molécula podría influir en el comportamiento bacteriano para restablecer el equilibrio luego de un tratamiento con antibióticos. Al aumentar los niveles de AI-2, se incrementó la proporción del *Phylum Firmicutes* (al cual pertenece el género *Lactobacillus*), produciendo una retroalimentación positiva, ya que aumentarían las bacterias productoras de AI-2 generando una amplificación de la respuesta en toda la comunidad (Thompson y cols., 2016).

Haddaji y cols. (2015), analizaron dos cepas probióticas de *L. casei*, las cuales, en condiciones de bajo pH, modificaron la composición bioquímica de la membrana celular, aumentando el nivel de saturación de los ácidos grasos y disminuyendo su adhesión *in vitro*. Según estos antecedentes, sería interesante medir el pH de los diferentes grupos experimentales del ensayo de adhesión realizado en el presente estudio, ya que un entorno ácido podría modificar la adhesión *in vitro* de *L. casei*.

Los resultados de este estudio, donde *L. casei* aumenta su capacidad de adhesión *in vitro* al ser expuesto a ciertas concentraciones de AI-2 funcional, apoyan lo descrito por otros autores. Buck y cols. (2009), observaron que *L. acidophilus* NCFM mutante *luxS*⁻ es incapaz de producir AI-2, provocando un significativo descenso de su adhesión *in vitro* a células epiteliales intestinales. Por otro lado, se

comparó el efecto que producía la molécula de AI-2 purificada y un inhibidor sintetizado de AI-2 en la adhesión *in vitro* de *L. rhamnosus* GG a células epiteliales intestinales de cerdo, encontrándose un incremento de la adhesión en presencia de AI-2 y un descenso de esta propiedad en presencia del inhibidor (Yeo y cols., 2015).

Se obtuvieron imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido luego de 6 días de incubación, para observar la formación de biopelículas monoespecie de *L. casei*. A través de un análisis visual cualitativo se puede observar un aumento de la adhesión a superficie, de la agregación bacteriana y formación de matriz extracelular, presumiblemente de exopolisacáridos, cuando *L. casei* es suplementado con el sobrenadante de *B. dentium* y con DPD a distintas concentraciones finales (Figura 13). El aumento en la agregación bacteriana y adhesión a superficies podría deberse, además, a una expresión aumentada de proteínas adhesinas en su pared celular (Sengupta, 2013). Sería interesante, en estudios posteriores, medir la producción de exopolisacáridos, así como la expresión de aquellos genes involucrados en la síntesis y secreción de éstos y de adhesinas de membrana.

También se visualizó un incremento en la formación de biopelícula, pero en menor nivel, cuando se agrega el medio condicionado de *L. casei*, indicando que podrían existir elementos secretados por este microorganismo que puedan modular la producción de matriz de exopolisacáridos. Villarroel (2017), identificó que *L. casei* ATCC 4646 es capaz de secretar AI-2 al medio externo e influir positivamente en su capacidad de formar biopelículas. Si bien, en ninguna imagen se observó una biopelícula madura, se determinó que a una cierta concentración de AI-2, se potenciaría la propiedad de *L. casei* de adherirse tanto a las superficies de los cubreobjetos como intraespecie, resultados que se condicen con lo observado en el ensayo de adherencia realizado en esta investigación.

Sin embargo, es posible que los sobrenadantes de *B. dentium* contengan otras moléculas, distintas de AI-2, que sean responsables del incremento en la adhesión y posterior formación de biopelículas monoespecie de *L. casei*.

Se debe tener en cuenta, que en la formación de la biopelícula dental los colonizadores primarios corresponden principalmente a las especies del género

Streptococcus del tipo no mutans y *Actinomyces* spp., las cuales tienen fenotipos más adecuados para unirse a las superficies dentales (Avila y cols., 2009; Jenkinson, 2011, Wright y cols., 2013). Mientras que *Lactobacillus* spp. son considerados colonizadores secundarios, ya que no están asociados con el inicio de la caries dental, sino que a la progresión (Tanzer y cols., 2001). Filoche y cols. (2004) demostraron que la formación de biopelículas monoespecie de *L. rhamnosus* y *L. plantarum* es escasa, pero en cocultivo con *Actinomyces* spp. se incrementa significativamente. Por esto, sería interesante analizar la adhesión a superficie, adhesión intraespecie y formación de matriz extracelular de *L. casei* en cocultivo con algún colonizador primario, el cual entregaría las condiciones óptimas para su co-agregación.

Se describió que *L. rhamnosus* GG CMPG5413, que posee el gen *luxS* mutado, es incapaz de formar biopelículas *in vitro*, ya que produce una cantidad significativamente menor de exopolisacáridos y existe una reducción en su distribución y longitud, en comparación a la cepa silvestre (Lebeer y cols., 2008). Por otro lado, se analizó la influencia de una mutación en el gen *luxS* y por ende la incapacidad de sintetizar AI-2, en la habilidad de *L. reuteri* 100-23 para formar biopelículas *in vitro* e *in vivo* en el tracto gastrointestinal de ratones, obteniéndose que la cepa mutante formaba biopelículas más gruesas en comparación con la silvestre, tanto *in vivo* como *in vitro*, lo cual podría deberse a una pérdida del *quorum sensing* y con ello una pérdida de la regulación de la proliferación o de un medio para reconocer los límites del hábitat (Tannock y cols., 2005).

Además, si se considera que la enzima LuxS posee dos funciones importantes, la primera como enzima en el Ciclo Metilo Activado y la segunda como enzima responsable de la producción de AI-2 (Wilson y cols., 2012), se podría pensar que, al anular la función de esta proteína, no tan solo se inhibe la producción de AI-2 sino que también otros productos del metabolismo central que podrían alterar de igual manera la adhesión y formación de biopelículas.

Actualmente éste sería el primer estudio que analiza el sistema de comunicación celular entre *B. dentium* y *L. casei*, proponiendo que corresponde a

quorum sensing y que la molécula de AI-2, producida y secretada por *B. dentium* potenciaría la adhesión y formación de biopelículas mono especie de *L. casei*.

8. CONCLUSIÓN

En esta investigación se analizó si *B. dentium* ATCC 27534 posee un sistema de comunicación celular de *quorum sensing* mediado por AI-2 funcional, y si esta molécula es capaz de favorecer la adhesión y formación de biopelículas tempranas en *L. casei* ATCC 4646, lo cual hasta la fecha no ha sido descrito como interacción entre estas especies bacterianas. Entonces, se concluye que:

- *B. dentium* ATCC 27534 es capaz de producir AI-2 funcional y secretarlo al medio externo.
- La secreción de AI-2 por *B. dentium* ATCC 27534 es dependiente de la fase de crecimiento.
- La adhesión y formación inicial de biopelículas *in vitro* de *L. casei* ATCC 4646 se ve potenciada en presencia de sobrenadantes de cultivo de *B. dentium* que poseen AI-2.

Estos resultados sugieren que este sistema de comunicación celular entre *B. dentium* ATCC 27534 y *L. casei* ATCC 4646, podría generar efectos positivos en los procesos de patogenicidad entre microorganismos cariogénicos, favoreciendo la permanencia de estas bacterias en las lesiones de caries.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas J, Griffen A, Darlis S, Lee A, Olsen I, Dewhirst F y cols. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46:1407-1417.

Avila M, Ojcius D, Yilmaz Ö (2009). The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol* 28:405-4011.

Badet C, Thebaud N (2008). Ecology of Lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J* 2:38-48.

Bassler B, Greenberg E, Stevens A (1997). Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 12:4043-4045.

Bassler B, Wright M, Showalter R, Silverman M (1993). Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* 9:773-786.

Beighton D, Gilbert S, Clark D, Matzourani M, al-Haboubi M, Ali F y cols. (2008). Isolation and identification of *Bifidobacteriaceae* from human saliva. *App Env Microbiol* 74:6457-6460.

Blango M, Muvey M (2009). Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations. *Curr Opin Microbiol* 12:177-181.

Bönecker M, Grossman E, Cleaton-Jones P, Parak R (2003). Clinical, histological and microbiological study of hand-excavated carious dentin in extracted permanent teeth. *SADJ* 7:273-278.

Buck B, Azcarate-Peril M, Klaenhammer T (2009). Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 107:269-279.

Burgos A, Pérez I, Becker M, Lefimil C (2014). Prevalencia de *Bifidobacterium* spp. en cavidad oral de niños chilenos y asociación a caries dental. XIX Congreso Nacional de Estudiantes de Odontología. Universidad Finis Terrae. Santiago.

Callaway A, Kostrzewa M, Willershausen B, Schmidt F, Thiede B, Küpper H y cols. (2013). Identification of Lactobacilli from deep carious lesion by means of species-specific PCR and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Clin Lab* 59:1373-1379.

Cannon J, Lee T, Bolanos J, Danziger L (2005). Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Microbiol Infect Dis* 24:31-40.

Caufield P, Li Y, Dasanayake A, Saxena D (2007). Diversity of Lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Res* 41:2-8.

Chhour K, Nadkarni M, Byun R, Martin F, Jacques N, Hunter N (2005). Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 43:843-849.

Chung W, Park Y, Lamont R, McNab R, Barbieri B, Demuth D (2001). Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. *J Bacteriol* 183:3903–3909.

Cuadra-Saenz G, Rao D, Underwood A, Belapure S, Campagna S, Sun Z y cols. (2012). Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing streptococci in oral biofilms. *Microbiol* 158:1783-1795.

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

Filoche SK, Anderson SA, Sissons CH. Biofilm growth of Lactobacillus species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 5:322-326.

Flemming H, Wingender J (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 28:623–633.

García P (2017). Producción de autoinductor-2 por *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 y sus efectos en la adhesión y formación de biopelículas. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista, U. de Chile.

Grigalauskiene R, Slabsinskiene E, Vasiliauskiene I (2015). Biological approach of dental caries management. *Stomatologija* 17:107-112.

Guo L, He X, Shi W (2014). Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Front Microbiol* 5:328.

Haddaji N, Khouadja S, Fdhila K, Krifi B, Ismail MB, Lagha R y cols. (2015). Acid stress suggests different determinants for polystyrene and HeLa cell adhesion in *Lactobacillus casei*. *J Dairy Sci* 7:4302-4309.

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

Hardie KR, Heurlier K (2008). Establishing bacterial communities by “word of mouth”: LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* 8:635-643.

Haukioja A, Söderling E, Tenovuo J (2008). Acid production from sugars and sugars alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria *in vitro*. *Caries Res* 42:449- 453.

He Z, Liang J, Tang Z, Ma R, Peng H, Huang Z (2015). Role of the *luxS* gene in initial biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *J Mol Microbiol Biotech* 25:60-68.

Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N (2009). Bacterial Interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88:982-990.

Jenkinson H (2011). Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol* 13:3077–3087.

Kianoush N, Adler C, Nguyen K, Browne G, Simonian M, Hunter N (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *Plos One* 9: e92940.

Klinke T, Kneist S, de Soet J, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A y cols. (2009). Acid production by oral strains of *Candida albicans* and Lactobacilli. *Caries Res* 43:83-91.

Kolenbrander P, Palmer Jr R, Periasamy S, Jakubovics N (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 7:471-480.

Kutsch VK (2014). Dental caries: an update medical model of risk assessment. *J Prosthet Dent* 111:280-285.

Lebeer S, Claes I, Verhoeven T, Shen C, Lambrichts I, Ceuppens J y cols. (2008). Impact of *luxS* and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 74:4711-4718.

Lebeer S, De Keersmaecker S, Verhoeven T, Fadda A, Marchal K, Vanderleyden J (2007b). Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *J Bacteriol* 189:860-871.

Lebeer S, Verhoeven T, Vélez M, Vanderleyden J, De Keersmaecker S (2007a). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 73:6768-6775.

Lima K, Coehlo L, Pinheiro I, Rocas I, Siqueira J. Jr. (2011). Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res* 45:21-30.

Loesche WJ (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50:353-380.

Loesche WJ (1992). The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dent Update* 19:68-74.

Luzanto C (2016). Resistencia a ácido e identificación de aislados clínicos de *Lactobacillus* spp. de la cavidad oral de niños de 7 a 11 años sin experiencia de caries versus con caries dentinarias profundas. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista, U. de Chile.

Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D (2009b). Association between *Bifidobacteriaceae* and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol* 24:32-37.

Mantzourani M, Gilbert S, Sulong H, Sheehy E, Tank S, Fenlon M y cols. (2009a). The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 43:308-313.

Marchant S, Brailsford S, Twomey A, Roberts G, Beighton D (2001). The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res* 35:397-406.

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

Marsh PD (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol* 149: 279–294.

Marsh PD (2006). Dental plaque as a biofilm and microbial community—implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6:S14.

McNab R, Ford S, El-Sabaeny A, Barbieri B, Cook G, Lamont R (2003). LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 1:274.

Merritt J, Kreth J, Shi W, Qi F (2005). LuxS controls bacteriocin production in *Streptococcus mutans* through a novel regulatory component. *Mol Microbiol* 57:960–969.

MINSAL (2017). Plan Nacional de Salud Bucal 2018 - 2030. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.

Modesto M, Biavati B, Mattarelli P (2006). Occurrence of the family *Bifidobacteriaceae* in human dental caries and plaque. *Caries Res* 40:271-276.

Moslehi-Jenabian S, Gori K, Jespersen L (2009). AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. *Int J Food Microbiol* 135:295–302.

Nakajo K, Takahashi N, Beighton D (2010). Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. *Caries Res* 44:431–437.

Ng WL, Bassler B (2009). Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet* 43:197–222.

Pérez I, Burgos A, Becker M, Olave A, Lozano C, Urzúa B, Morales I, Lefimil C (2014). *Bifidobacterium* spp. en saliva de adultos chilenos: relación con caries. XXVI Reunión Anual de IADR División Chile. Santiago.

Petersen P (2003). The World Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 31: 3-23.

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gómez F, Tagami J y cols. (2017). Dental caries. *Nat Rev Dis Primers* 3:17030.

Piwat S, Teanpaisan R, Thitasomakul S, Thearmontree A, Dahlén G (2010). *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol Oral Microbiol* 25:157-164.

Rickard A, Campagna S, Kolenbrander P (2008). Autoinducer-2 is produced in saliva-fed flow conditions relevant to natural oral biofilms. *J Appl Microbiol* 6:2096-2103.

Rickard A, Palmer Jr R, Blehert D, Campagna S, Semmelhack M, Eglund P y cols. (2006). Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol* 60:1446–1456.

Ruiz L, Sánchez B, de los Reyes-Gavilán C, Gueimonde M, Margolles A (2009). Coculture of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* alters their protein expression profiles and enzymatic activities. *Int J Food Microbiol* 133:148-153.

Sengupta R, Altermann E, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Roy NC (2013). The role of cell surface architecture of *Lactobacilli* in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm* 2013:237921.

Song J, Qin Q, Li T, Ren F, Zhang H, Xie Y y cols. (2018). Impact of carbohydrates on autoinducer-2 secretion of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68. *Lett Appl Microbiol* 66:340-346.

Sun J, Daniel R, Wagner-Dobler I, Zeng A (2004). Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication?: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* 4:36.

Sun Z, He X, Brancaccio V, Yuan J, Riedel C (2014). Bifidobacteria exhibit LuxS-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation. *Plos One* 9:e88260.

Taga ME, Xavier KB (2011). Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. *Curr Protoc Microbiol* 23:1C.1.1-1C.1.15.

Takahashi N, Nyvad B (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 42:409-418.

Takahashi N, Nyvad B (2011). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J Dent Res* 90:294-303.

Tannock GW, Ghazally S, Walter J, Loach D, Brooks H, Cook G y cols. (2005). Ecological behavior of *Lactobacillus reuteri* 100-23 is affected by mutation of the *luxS* gene. *Appl Environ Microbiol* 71:8419-8425.

Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM (2001). Microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 10:1028-1037.

Theilade E (1986). The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontal* 13:905-911.

Thompson JA, Oliveira RA, Xavier KB (2016). Chemical conversations in the gut microbiota. *Gut Microbes* 7:163-170.

Turovskiy Y, Chikindas ML (2006). Autoinducer-2 bioassay is a qualitative, not quantitative method influenced by glucose. *J Microbiol Methods* 3:497-503.

van Houte J, Lopman J, Kent R (1996). The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* 75:1008–1014.

Ventura M, Turrone F, Zomer A, Foroni E, Giubellini V, Bottacini F (2009). The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *Plos Genet* 12:e1000785.

Villarroel R (2017). Participación de *quorum sensing*, mediante autoinductor-2, en la adhesión y desarrollo de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista, U. de Chile.

Wilson CM, Aggio RBM, O'Toole PW, Villas-Boas S, Tannock GW (2012). Transcriptional and metabolomic consequences of *luxS* inactivation reveal a metabolic rather than quorum-sensing role for LuxS in *Lactobacillus reuteri* 100-23. *J Bacteriology* 174:1743-1746.

Wolff D, Frese C, Maier-Kraus T, Krueger T, Wolff B (2013). Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects. *Caries Res* 47:69-77.

Wright C, Burns L, Jack A, Back C, Dutton L, Nobbs A y cols. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol* 28:83-101.

Yeo S, Park H, Ji Y, Park S, Yang J, Lee J y cols. (2015). Influence of gastrointestinal stress on autoinducer-2 activity of two *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Ecol* 7.

10. ANEXOS Y APÉNDICES

11.1 Anexo 1



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°67

Santiago, 15 de Diciembre de 2015.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación Fondecyt Iniciación N°11150928, 2015 titulado “**Role of LuxS and autoinducer-2 in the interaction between *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium dentium*, two cariogenic microorganisms**”. El Investigador Responsable de este proyecto es la Dra. Claudia Lefimil Puente, Académica del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad Odontología, Universidad de Chile.

Todos los ensayos a realizar que involucran clonamientos, formación de biopelículas y adherencia bacteriana, se realizarán en el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología, cuyo personal que colaborará se encuentra debidamente entrenado en esta área. Además, ellos estarán bajo la supervisión de la Dra. Lefimil.

El CIB certifica que la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico, químico, patógenos y ADN recombinante a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Lefimil para ser presentado al Concurso Fondecyt Iniciación 2015.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

11.2 Anexo 2



FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITÉ ÉTICO
CIENTIFICO

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Ed 28/12/2015

Dr. Eduardo Fernández Pdte./ Dr. Marco Cornejo / Dra. María Angélica Torres/ Dr. Eduardo Rodríguez/ Dr. Mauricio Baeza/ Sra. Paulina Navarrete/ Sr. Roberto La Rosa

ACTA N°: 2015/11

1. **Acta De Aprobación De Protocolo De Estudio N° 2015/13** : Fondecyt Iniciación 2015/11150928
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

Dr. Eduardo Fernández Godoy
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo O.
Vicepresidente CEC

Sra. Paulina Navarrete C.
Secretaria Ejecutiva CEC

Dr. Alfredo Molina B.
Miembro Alterno

Dr. Roberto La Rosa H.
Miembro permanente del CEC

Dr. Mauricio Baeza Paredes
Miembro permanente del CEC

3. **Fecha de Aprobación:** 21/12/2015
4. **Titulo completo del proyecto:** Proyecto Fondecyt Inicio 11150928. "Role of LuxS and autoinducer-2 in the interaction between *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium dentium*, two cariogenic microorganisms".
5. **Investigador responsable:** Dra. Claudia Lefimil Puente PhD, Académico del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD), de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
6. **Institución Patrocinante:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

7. Documentación Revisada y Aprobada:

- Proyecto Fondecyt Inicio 11150928. "Role of LuxS and autoinducer-2 in the interaction between *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium dentium*, two cariogenic microorganisms". Versión del 24/11/2015.
- Consentimiento Informado (CI) versión 16/12/2015 correspondiente al Proyecto Fondecyt Inicio 11150928. "Role of LuxS and autoinducer-2 in the interaction between *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium dentium*, two cariogenic microorganisms". Versión del 24/11/2015.
- Currículo del único investigador y responsable (IR) Dra. Claudia Lefimil Puente PhD.
- Carta del Dr. Gonzalo Rodríguez, colaborador directo de la investigación, versión 26/05/2015.
- Carta de aceptación de la Directora de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile Dra. Alejandra Angulo, versión del 17/12/2015.

8.- Carácter de la población: Pacientes en estado de salud bucal, que voluntariamente donen una muestra de saliva.

9.- Fundamentación de la aprobación

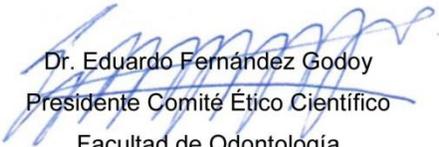
El objetivo de esta investigación es esclarecer el tipo de comunicación que existe entre bacterias cariogénicas del tipo *Lactobacillus* con bacterias del tipo *Bifidobacterium*, y como esta comunicación afecta la presencia y formación de placa dental. Para esto se utilizarán bacterias adquiridas comercialmente que han sido obtenidas desde caries, y se requiere además saliva humana a los sujetos voluntarios invitados a participar, a los que se les realizará un examen bucal para evaluar su salud oral en general. En caso de calificar dentro de los criterios de inclusión se le solicitará donar una muestra de saliva de 2 ml, procedimiento inocuo y rápido para el participante. Además la IR declara que los sujetos voluntarios no correrán ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que la toma de muestra de saliva no produce daño ni dolor. La investigadora declara que se tomarán todas las medidas de bioseguridad Se entregará la información a los participantes y se tomará un consentimiento informado, explicando objetivos del estudio, nulos riesgos, confidencialidad de los datos y procesamiento de las muestras del presente estudio. El proyecto fue revisado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y no presenta reparos éticos, todos los miembros declararon no tener conflictos de interés, se ajusta a las normas de investigación en seres humanos. El formulario del consentimiento informado cumple con los requisitos exigidos, y los antecedentes curriculares de la investigadora principal garantizan la ejecución del estudio dentro de los marcos éticamente aceptables. Este estudio hace referencia a la utilidad de la información obtenida a partir de los

datos del estudio, y su aporte social que podría ser relevante a la etiopatogenia de la caries, enfermedad altamente prevalente en la población.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba por unanimidad de sus miembros el estudio: "Role of LuxS and autoinducer-2 in the interaction between *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium dentium*, two cariogenic microorganisms" bajo la conducción de la Dra. Claudia Lefimil Puente, académica del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

La Dra. Lefimil asume el compromiso de enviar a este Comité cualquier enmienda realizada durante la ejecución del protocolo y una copia del Informe final de resultados. Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si lo considera necesario y el investigador deberá, bajo mutuo acuerdo, presentar los antecedentes solicitados.

Dicho estudio se llevará a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología, y el examen clínico intraoral y la toma de muestras de saliva se realizará en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología, bajo la supervisión de la Dra. Claudia Lefimil Puente, como Investigador Principal.


Dr. Eduardo Fernández Godoy
Presidente Comité Ético Científico
Facultad de Odontología
Universidad de Chile



C/C.
Investigador Principal.
Secretaría C.E.C.

11.3 Anexo 3

Edición del CI 16/12/2015



Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación **Dirigido a Adultos mayores de 18 años**

- Título del Protocolo:** Rol de LuxS y el autoinductor-2 en la interacción entre *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium dentium*, dos microorganismos cariogénicos.
(Role of LuxS and autoinducer-2 in the interaction between *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium dentium*, two cariogenic microorganisms).
- Investigador Principal:** Claudia Lefimil Puente, Académico Área Bioquímica, Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas.
- Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago.
- Nombre del Participante:**

Este documento de Consentimiento Informado consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).

Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Claudia Lefimil Puente y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo, Beneficios, Tipo de Intervención y procedimiento, Riesgos, Confidencialidad y Difusión de datos, Criterios para selección de los participantes en el estudio y Aclaraciones.

Justificación de la Investigación

La caries dental es uno de los principales problemas de salud oral a nivel mundial, afectando a casi el 100% de la población adulta. Su origen se asocia con la presencia de numerosas bacterias adheridas sobre los dientes, formando lo que se conoce como placa bacteriana. En esta placa viven bacterias que producen ácidos, produciendo pérdida del esmalte dental y la formación de caries. En este estudio se propone que dos de estas bacterias (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) pueden comunicarse entre sí, y de ese modo, pueden incrementar su capacidad de producir caries, y se quiere analizar cómo son capaces de hacerlo.



Objetivo

La presente investigación tiene por objetivo esclarecer el tipo de comunicación que existe entre bacterias cariogénicas del tipo *Lactobacillus* con bacterias del tipo *Bifidobacterium*, y como esta comunicación afecta la presencia y formación de placa dental. Para esto se utilizarán bacterias adquiridas comercialmente que han sido obtenidas desde caries, y se requiere además saliva humana.

Beneficios

Usted no recibirá beneficio directo por participar en este estudio, sin embargo los resultados que se generen serán información muy importante y no disponible sobre cómo las bacterias cariogénicas se comunican entre sí y pueden producir caries. Además de esto, usted recibirá por parte de un profesional odontólogo un informe de su salud oral, así como orientación para mejorarla.

Tipo de Intervención y Procedimiento

Si usted decide participar se le realizará un examen bucal para evaluar cómo se encuentra su dentadura y su salud oral en general. Si usted está libre de caries y sus encías se encuentran sanas se le solicitará donar una muestra de saliva de 2 ml. Para esto deberá no consumir alimentos o bebidas por 2 horas previo a la toma de muestra, la que será colectada en un frasco plástico estéril, y trasladada al Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología, en donde será mezclada con muestras de otros 4 donantes, en un recipiente único, perdiéndose completamente la identidad de cada muestra. Luego de esto, esta mezcla de muestras salivales será centrifugada para eliminar todas las células y bacterias que contenga.

Riesgos

Usted no correrá ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que la toma de muestra de saliva no produce daño ni dolor. Además, estas muestras sólo serán utilizadas en este estudio, no siendo almacenadas para utilizarlas a futuro en estudios genéticos o de otro tipo.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: Adultos mayores de 18 años, sin patologías orales (caries o gingivitis/periodontitis), no fumadores, que no hayan utilizado antibióticos los últimos 3 meses.

Los criterios de exclusión serán: individuos menores de 18 años, que hayan consumido antibióticos durante los 3 últimos meses o que sean fumadores.

Confidencialidad y difusión de datos.

La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de usted serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención.
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- Si usted lo desea puede retirar su muestra de saliva del estudio, pero sólo hasta antes de que haya sido procesada, ya que al ser mezclada con las muestras de los demás donantes será imposible de ser separada para su devolución.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.



Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
3. Conozco los beneficios de participar en la Investigación.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
5. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
6. En caso de cualquier duda puede acudir a Claudia Lefimil, mail clefimil@odontologia.uchile.cl, de lunes a viernes de 08:00 a 18:00 hrs, o vía telefónica al 229781792 o dirigirse al Dr. Eduardo Fernández, Presidente del Comité Ético Científico, Facultad de Odontología, Universidad de Chile al correo electrónico cec.fouch@odontologia.uchile.cl.

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

Nombre del participante: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre del Director del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante: _____

Firma: _____

Fecha: _____

