



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

**LISOZIMA Y LACTOFERRINA: EFECTO DE PROTEÍNAS SALIVALES SOBRE
Lactocaseibacillus casei, UNA BACTERIA CARIOGÉNICA**

Diego Esteban Torres Chacón

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Andrea Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Rafael Ignacio Contador Cotroneo

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



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

**LISOZIMA Y LACTOFERRINA: EFECTO DE PROTEÍNAS SALIVALES SOBRE
Lactocaseibacillus casei, UNA BACTERIA CARIOGÉNICA**

Diego Esteban Torres Chacón

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Andrea Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Rafael Ignacio Contador Cotroneo

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

*Dedicado a mi madre, mi padre y Lore,
mi familia San Fernandina*

*Y a Gabo, Coni y Fran,
mi familia Santiaguina*

Agradecimientos

A mi madre, por su amor inconmensurable y por ser un pilar fundamental en mi vida. No hubiera podido soñar y embarcarme en tantas locuras si no hubiera tenido su apoyo en el proceso.

A Lore, por su gran cariño y por haberme abierto tantas posibilidades mientras realizaba su propio camino, permitiéndome así llegar a donde estoy.

A mi padre. A pesar de nuestras diferencias, agradezco el apoyo que me has entregado, indispensable para mi desarrollo profesional.

A Gabito. Por su amistad y apoyo incondicional. Me cuidó como un hermano en este Santiago inhóspito e hizo suyas mis propias locuras. No tengo como agradecer tanto apañe en todos estos años.

A Coni, mi gran amiga. Mi compañera de stress y de causas perdidas. Se que seguiremos alentándonos mutuamente para seguir siendo cada vez mejores, como también nivelándonos para no caer en la locura, mientras tratamos de conquistar el mundo.

A Fran, me alegra demasiado que nuestra amistad perdure. Estoy muy agradecido por su apoyo en este mundo alocado. Estaré expectante a ver cómo sigue transformándose en una gran profesional, porque como persona, no hay nada más que hacer.

A prof. Claudia Lefimil. No tengo palabras para agradecer tanto apoyo en tantas locuras que se me ocurrieron. Es una alegría y un gran orgullo haber sido su ayudante por tantos años. Ojalá lograr ser la mitad de la maravillosa persona y profesional que es. Es indiscutiblemente mi modelo a seguir. Infinitas gracias.

A Emilio Avendaño, un gran profesional. Estoy muy agradecido por su apoyo. Logró orientarme en ordenar mis ideas, permitiéndome ver más claro. Ojalá estuviera plagado de profesionales con su entrega.

A Almendra, Nico, Nati, Cony Silva, Rodrigo Fuentes, Rafael Souper, Carlos Bobadilla, Jean, Nelson, Darco, Sole, Grace, Seba Galleguillos, Nati Endo, Maca Leyton, Cami Farías, Loreto Hernández, Edu Barriga, Pía Martínez, Marco Troncoso. Sin su apoyo, cariño, risas y locuras no hubiera sido lo mismo.

Y mención honrosa al Dr. André Latapiat, Dr. Guillermo Flores, Dr. Walter Díaz, Dr. Pablo Milla, Dra. Andrea Pizarro (Q.E.P.D.), Dra. Natalia Gamboa, Dr. Rubén Soto, Dr. Wladimir Pinto, Dr. Rafael Contador, cuyo apoyo, enseñanza y profesionalismo marcaron la diferencia del tipo de profesional que quiero ser.

A todos ellos, Gracias Totales.

INDICE

1. RESUMEN.....	7
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1. SALIVA HUMANA.....	8
2.1.1 COMPOSICIÓN SALIVAL.....	9
2.1.1.1 LISOZIMA	10
2.1.1.2. LACTOFERRINA	13
2.2. <i>Lactocaseibacillus</i> spp.	17
2.2.1 <i>Lactocaseibacillus</i> spp. Y CARIES DENTAL.....	19
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVO GENERAL.	21
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
6. METODOLOGÍA.	22
6.1. CEPA BACTERIANA, MEDIO Y CONDICIÓN DE CULTIVO.	22
6.2. PROTEÍNAS SALIVALES.....	22
6.3. EXPERIMENTACIÓN	22
6.3.1. EFECTO DE LISOZIMA Y LACTOFERRINA EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE <i>L. CASEI</i> ATCC 4646.	22
6.3.2. EFECTO DE LISOZIMA Y LACTOFERRINA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE <i>L. CASEI</i> ATCC 4646.....	23
6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
7. RESULTADOS.....	25
7.1 EFECTO DE LISOZIMA SALIVAL SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI</i> ATCC 4646.	25
7.2 EFECTO DE LACTOFERRINA SALIVAL SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI</i> ATCC 4646.	26
7.3 EFECTO DE LISOZIMA SALIVAL SOBRE LA FORMACIÓN DE	

BIOPELÍCULAS DE <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI</i> ATCC 4646.....	28
7.4 EFECTO DE LACTOFERRINA SALIVAL SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI</i> ATCC 4646.....	28
8. DISCUSIÓN.....	30
9. CONCLUSIONES	37
10. REFERENCIAS	38
11. ANEXOS.....	47
11.1 ANEXO 1. CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRIDO..	47

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

Lisozima y lactoferrina son proteínas presentes en saliva, agentes antimicrobianos no específicos. Lisozima salival degrada la pared celular bacteriana y lactoferrina captura hierro. Las diferentes propiedades antibacterianas de estas proteínas permiten mantener la homeostasis de la cavidad bucal. *Lacticaseibacillus casei* son bacilos Gram positivo, ácido-lácticos. Se ha reportado su presencia en cavidad oral y en lesiones de caries dentinaria.

OBJETIVOS:

Determinar el efecto *in vitro* de lisozima y lactoferrina sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646.

METODOLOGÍA:

L. casei ATCC 4646 fue cultivado con concentraciones seriadas de lisozima o lactoferrina salival. El estudio de crecimiento bacteriano se realizó a 37°C en condiciones aeróbicas y agitación durante 10 h. Para la formación de biopelículas, los cultivos se incubaron durante 5 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y sin agitación. Posteriormente las biopelículas fueron teñidas con cristal violeta. Ambos estudios fueron medidos mediante espectrofotometría en un equipo Synergy HT. El análisis estadístico se realizó mediante el software Graphpad Prism 8.0.

RESULTADOS:

No se observó un efecto estadísticamente significativo de lisozima o lactoferrina sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646.

CONCLUSIONES:

El crecimiento y la formación de biopelículas de *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646 *in vitro* no se ve afectado por la presencia de lisozima o lactoferrina.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. SALIVA HUMANA

La saliva humana es un fluido especializado, caracterizado principalmente por mantener la homeostasis de la cavidad bucal, como también favorecer en la fonación, masticación, deglución de alimentos, experiencia gustativa, entre otros (Wang y cols., 2018; Brown y cols., 2021). Es secretada constantemente por glándulas salivales, compuestas por células especializadas del epitelio, cuyos ductos desembocan en la cavidad oral (Marsh y cols., 2015). Su estructura consta de acinos y conductos intercalados que permiten la primera fase de secreción de saliva, la que luego recorre un sistema de ductos glandulares hasta desembocar en la boca. En su primera fase, los acinos secretan una solución isotónica, producto de un ultrafiltrado plasmático, que durante su paso por el sistema de ductos glandulares se ve modificado a una secreción hipotónica, por una reabsorción de iones de sodio y cloruro dependiente de energía. La secreción en sí está controlada por el sistema nervioso autónomo (Dodds y cols., 2005).

La producción y el tipo de saliva secretada varía dependiendo de la glándula involucrada. El 90% del total de saliva es secretado por las glándulas salivales mayores, mientras que el resto proviene de las glándulas salivales menores y fuentes no glandulares como el fluido gingival crevicular (FGC) (Gao y cols., 2015).

La saliva es una mezcla compleja de componentes, teniendo un predominio de agua (99,5%). Dentro de su composición restante, el 0,3% está formado por proteínas salivales y el 0,2% está constituido por iones inorgánicos y elementos trazas. Tanto elementos orgánicos como inorgánicos brindan a la saliva funciones específicas y únicas, de las cuales pueden ser funciones propias de las moléculas o desencadenarse al interactuar con otras moléculas, estructuras o microorganismos dentro de la cavidad oral (Brown y cols., 2021).

2.1.1 COMPOSICIÓN SALIVAL

Dentro de los componentes inorgánicos de la saliva se encuentra el ion bicarbonato (HCO_3^-) que regula el pH salival actuando como un amortiguador (buffer) ácido-base. También cuenta con electrolitos como iones de calcio y fosfato, cuya función principal es mantener la sobresaturación salival respecto al mineral dental, conservando la integridad de su superficie (Dodds y cols., 2004; Marsh y cols., 2015).

Entre los componentes orgánicos de la saliva se encuentran principalmente proteínas, las cuales pueden encontrarse suspendidas en la saliva o bien formando parte de una película sobre las superficies dentales, conocida como película salival adquirida (PSA). Dentro de estas proteínas podemos encontrar a las proteínas ricas en prolina (PRP), las estaterinas, mucinas, amilasa, histatinas, entre otras. Las PRP corresponden al 70% de la saliva secretada por una de las glándulas mayores, la parótida y se clasifican en PRP ácidas y básicas, cumpliendo un papel multifuncional dependiendo del tipo. Las PRP ácidas tienen dominios que permiten su unión a cristales de hidroxiapatita (Kauffman y Keller, 1979; Lynge y Belstrøm, 2019). Por otra parte, las estaterinas son responsables de regular la remineralización, evitando la precipitación inespecífica de sales de Ca^{2+} sobre la superficie dental (Hay y cols., 1984; Lynge y Belstrøm, 2019). Además, se ha descrito que las PRP y estaterinas permiten la unión de microorganismos como *Streptococcus mutans* a la superficie dental, favoreciendo la formación de la biopelícula dental (Gibbons y Hay, 1989; Lynge y Belstrøm, 2019). Las mucinas son glicoproteínas secretadas mayormente por otras glándulas mayores, submandibular y sublingual. Sus propiedades radican en la hidratación y lubricación de superficies orales y la aglutinación de bacterias orales (Gao y cols., 2015). Las amilasas son enzimas que catalizan la degradación de polisacáridos complejos como glucógeno y almidón (Sánchez y cols., 2010). Las histatinas quelan iones metálicos y presentan actividad antimicrobiana, favoreciendo la eliminación de microorganismos presentes en la superficie dental durante el recambio del flujo salival (Amerongen y Veerman, 2002).

Además, una gran variedad de proteínas salivales presenta propiedades antimicrobianas o participan en la aglutinación microbiana. Dentro de éstas se cuentan lisozima, lactoferrina, peroxidasa, inmunoglobulina A secretora, aglutininas y cistatinas, que, de manera independiente o en conjunto, pueden tener efecto en las bacterias orales (Lynge y Belstrøm, 2019). Éstas, aun estando en concentraciones pequeñas en relación con otros componentes, presentan diferentes funciones protectoras importantes para la homeostasia en salud en boca. En relación con los objetivos de este estudio revisaremos en detalle lisozima y lactoferrina.

2.1.1.1 LISOZIMA

Es una glicoproteína catiónica de 14,7 kDa de peso molecular (Krzyściak y cols., 2015; Gálvez-Iriqui y Plascencia-Jatomea, 2020). Está presente en diferentes fluidos corporales, encontrándose en grandes concentraciones en el plasma, fluido amniótico, saliva, lágrimas y leche materna (Krzyściak y cols., 2015) y en concentraciones menores en orina, bilis y fluido cerebroespinal (Moslemi y cols., 2015). Lisozima, junto con otros componentes como los del sistema del complemento, protegen al organismo contra infecciones (Krzyściak y cols., 2015). Presenta principalmente propiedades antibacterianas (Wang y cols., 2018), antivirales, antifúngicas (Hatti y cols., 2007; Krzyściak y cols., 2015), antiinflamatorias, anticancerígenas y actividad inmunomoduladora (Ferraboschi y cols., 2021).

Posee acción muramidasa que consiste en la capacidad de catalizar la hidrólisis del enlace glucosídico β -1,4, entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetil-D-glucosamina, presentes en la capa de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana, logrando así su ruptura, produciendo efectos como la hiposmolarización del microorganismo (Gálvez-Iriqui y Plascencia-Jatomea, 2020; Lynge y Belstrøm, 2019; Krzyściak y cols., 2015). Su mayor actividad antibacteriana ocurre en bacterias Gram positivo (Moslemi y cols., 2015), en cambio en bacterias Gram negativo su efecto es reducido debido a la existencia

de polipéptidos adicionales y la capa de lipopolisacáridos presente en la membrana externa (Krzyściak y cols., 2015; Ferraboschi y cols., 2021).

Por otra parte, se ha descrito que lisozima puede afectar en la agregación y la adherencia bacteriana a superficies e incluso la activación de la autólisis bacteriana mediante la destrucción de la pared celular (Lenander-Lumikari y Loimaranta, 2000; Rudney and Smith, 1985). Claro ejemplo es la disminución de la adhesión de *S. mutans* a cristales de hidroxapatita en presencia de lisozima (Hatti y cols., 2007; Kho y cols., 2005).

También se ha descrito que lisozima puede producir la aglutinación de bacterias Gram positivo como *S. mutans*, otros *Streptococcus* spp. y bacterias Gram negativo como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Wang y cols., 2019).

Lisozima se encuentra presente en la boca por su secreción a través de los acinos glandulares de las glándulas salivales mayores y menores, por granulocitos neutrófilos y por el FGC (Moslemi y cols., 2015).

Con respecto a los niveles salivales de lisozima no es posible encontrar un consenso ya que, en los estudios existentes, son diferentes los tipos de saliva estudiada, pudiendo ser o el total de saliva secretada o sólo saliva de parótida o incluso diferenciarse entre saliva estimulada o no estimulada. También existe discrepancia en los diferentes métodos usados para cuantificarlos. En la Tabla 1 se expone un cuadro resumen de las concentraciones de lisozima salival descritas en la literatura, los cuales van desde 9,5 µg/ml hasta 98 µg/ml.

Tabla 1*: Cuadro resumen de concentraciones de lisozima salival reportadas en la literatura.

Concentración (µg/ml)	Tipo de saliva	Variantes	Tipo de dentición	Estado de salud sistémica y bucal	Autor
98,9 ± 19,6	Saliva total no estimulada	-Mujeres -20 a 26 años -Noruega	Dentición permanente	-Se evalúa índice de placa y salud gingival -Sin enfermedades sistémicas -No se especifica estado de salud cariológico	Turner y cols., 1991.
30,9 ± 13,0	Saliva total -No se especifica saliva estimulada no	-No se especifica si es o -7 a 12 años -Colombia	Dentición mixta	-ceo-s entre 11 a 35 -No se especifica estado de salud sistémico	Cole y cols., 1981.
18,6 ± 4,6	Saliva total -No se especifica saliva estimulada no	-No se especifica si es o -51 a 75 años -USA	Dentición permanente	-CEO-D entre 7 a 25 -Con enfermedad periodontal -No se especifica estado de salud sistémico	
26,9 ± 11,6	Saliva total -No se especifica saliva estimulada no	-Sexo masculino -3 a 15 años -Brasil	Dentición primaria, mixta y permanente	-Sin enfermedad sistémica -No se especifica estado de salud periodontal y cariológico	Kmiliauskis y cols., 2005.
23,4 ± 12,5		-Sexo femenino -3 a 15 años -Brasil			
34,0 ± 15,0		-Sexo masculino -20 a 42 años -Brasil	Dentición permanente		
25,0 ± 7,0		-Sexo femenino -20 a 42 años -Brasil			
51,64 ± 2,82	Saliva total no estimulada	-No se especifica edad ni sexo -China	Sin especificar	-Sin enfermedad sistémica -No se especifica estado de salud periodontal y cariológico	Sun y cols., 2016.
9,5 ± 1,1	Saliva total no estimulada	-No se especifica sexo -3 a 6 años -Irán	Dentición primaria	-Sin experiencia de caries -No se especifica estado de salud sistémico o salud periodontal	Moslemi y cols., 2015.
10,62 ± 1,83	Saliva total estimulada	-Niños entre 3 a 5 años y niñas -India	Dentición primaria	-Caries temprana de la infancia (ceo-d > 5) -Sin enfermedades sistémicas -No se especifica estado de salud periodontal	Sharma y cols., 2020.

*(Tabla realizada fue elaborada en este estudio)

Se ha reportado cierta correlación entre los niveles de lisozima salival y desarrollo de lesiones de caries. Estudios en niños brasileños de 12 años y sin enfermedades sistémicas, encontraron mayores concentraciones de lisozima salival en individuos con menores valores de COP-D (Felizardo y cols., 2010). Además, Moslemi y cols., (2015) analizaron las concentraciones de lisozima salival en niños iraníes entre 3 a 6 años, determinando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre aquellos con experiencia de caries y libres de caries; siendo $9,5 \pm 1,1$ $\mu\text{g/ml}$ sin experiencia de caries, en comparación a los $2,1 \pm 6$ $\mu\text{g/ml}$ de niños con experiencia de caries (Moslemi y cols., 2015). Por el contrario, Mass y cols. (2002) reportaron la presencia de mayores niveles de lisozima salival y mayores recuentos de *S. mutans* y bacterias ácido-lácticas en niños y adolescentes entre 5 y 17 años con experiencia de caries en comparación al grupo libre de caries (Mass y cols., 2002).

Por otra parte, Stuchell y Mandel (1983) reportaron que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de lisozima en saliva estimulada, ya sea de parótida o sublingual y submandibular, entre personas adultas con y sin experiencia de caries (Stuchell y Mandell 1983). Hao y Lin (2009), también reportan que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de lisozima salival presentes en niños con y sin experiencia de caries (Hao y Lin, 2009)

En otros escenarios, estudios indican que la concentración de lisozima en saliva aumenta en presencia de infecciones de *Candida* spp. (Yeh y cols, 1997).

2.1.1.2. LACTOFERRINA

Lactoferrina es una glicoproteína catiónica de tipo metaloproteínasa de peso molecular 80 kDa, unida reversiblemente a hierro (Arslan y cols., 1982; Drago, 2006; Wang y cols., 2019). Se puede encontrar en diferentes fluidos corporales como saliva, lágrimas, páncreas y bilis (Drago, 2006; Moslemi y cols., 2015).

La lactoferrina posee en su estructura dos ácidos siálicos que presentan unidades de oligosacáridos en su extremo N-terminal (Spik y cols., 1982). La presencia de varios dominios presentes en su cadena polipeptídica le brindan propiedades antimicrobianas (Moslemi y cols., 2015) ya sean acciones bacteriostáticas o bactericidas. También presenta propiedades fungicidas, antivirales (Amerongen y Veerman, 2002; Pedersen y Belstrøm, 2019) e inmunomoduladoras (Moslemi y cols., 2015). También presenta propiedades de lubricante, al estar interaccionando con mucinas (Brown y cols., 2021).

En relación con su unión a hierro, lactoferrina puede encontrarse en dos formas, como holo-lactoferrina, que corresponde a la proteína unida a hierro, y como apo-lactoferrina que es la proteína libre del mineral. Estas diferencias estructurales pueden entregarle diferentes funciones (Wang y cols., 2019). Se ha descrito que apo-lactoferrina posee su acción bacteriostática mediante su capacidad de quelar hierro del medio extracelular, mecanismo con el cual priva de este micronutriente esencial a los microorganismos (Arnold y cols., 1982; Berlutti y cols., 2011; Moslemi y cols., 2015).

Su acción bactericida la ejerce de manera directa por su capacidad de unirse a porinas y al lípido A de los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativo. Esta unión a componentes de la membrana externa cargados negativamente permite la liberación de dichas moléculas, favoreciendo la desestabilización y subsecuente pérdida de permeabilidad de la membrana bacteriana. En el caso de bacterias Gram positivo, lactoferrina requiere realizar una unión sobre los componentes de la pared celular para poder ejercer su acción bactericida (Drago, 2006).

Apo-lactoferrina produce un efecto bactericida en diferentes bacterias del género *Streptococcus* (Arnold y cols., 1982). Además, su propiedad antibacteriana radica en la aglutinación con ciertas bacterias como *S. mutans*, propiciando su remoción de la cavidad oral mediante acción mecánica de la saliva y de la deglución de las bacterias aglutinadas (Moslemi y cols., 2015). Esta acción no se

logra en otras especies de *Streptococcus* o de bacterias como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (Wang y cols., 2019). Apo-lactoferrina también puede inhibir la adhesión de microorganismos como *Streptococcus sobrinus* a la superficie mineral dental (Visca y cols., 1989).

Por otra parte, Berlutti y colaboradores (2004) reportaron que holo-lactoferrina bovina es capaz de inhibir la adhesión de *S. mutans* planctónico, agregado o formando biopelículas en superficies abióticas (Berlutti y cols., 2004). Otro estudio reportó que holo-lactoferrina inhibe la adhesión inicial a superficies de vidrio de *Streptococcus gordonii*, pero no de bacterias como *Fusobacterium nucleatum* o *Porphyromonas gingivalis* (Arslan y cols., 2009).

La lactoferrina salival se encuentra en la cavidad oral por su secreción por células serosas presentes en glándulas salivales mayores y menores, pudiendo también estar presente en el FGC (Wang y cols., 2019; Moslemi y cols., 2015).

Al igual que lo señalado para lisozima salival, no es posible determinar un consenso de las concentraciones de lactoferrina en saliva por las diferentes variantes existentes. En la Tabla 2 se expone un cuadro resumen de las concentraciones de lactoferrina salival descrita en la literatura, los cuales van desde 0,003 µg/ml hasta 25,6 µg/ml.

Se ha reportado relación entre los niveles de lactoferrina salival y desarrollo de lesiones de caries. Sikorska y cols., (2002) reportaron en un estudio en adolescentes polacos de 15 años y sin enfermedades sistémicas, valores menores de COP-D en aquellos con niveles más bajos de lactoferrina salival, mientras que también se evidenciaron valores de COP-D más altos correlacionados a mayores niveles de lactoferrina salival, llegando a una concentración máxima de alrededor 6 µg/ml (Sikorska y cols., 2002). Jentsh y cols. (2004) en un estudio longitudinal de 4 años en adultos alemanes relaciona positivamente un bajo incremento de índice COP-D en pacientes con bajos niveles de lactoferrina en saliva no estimulada (Jentsh y cols., 2004).

Tabla 2*: Cuadro resumen de concentraciones de lactoferrina salival reportadas en la literatura.

Concentración (µg/ml)	Tipo de saliva	Variantes	Tipo de dentición	Estado de salud sistémica y bucal	Autor
25,6 ± 3,1	Saliva total no estimulada	-Mujeres -20 a 26 años -Noruega	Dentición permanente	-Se evalúa índice de placa y salud gingival -No se especifica estado de salud cariológico. -Sin enfermedades sistémicas	Turner y cols., 1991
9 ± 10	Saliva total -No especifican si saliva es estimulada o no	-No se especifica sexo -7 a 12 años -Colombia	Dentición mixta	-ceo-s entre 11 a 35 -No se especifica estado de salud periodontal ni sistémica	Cole y cols., 1981
24 ± 9	Saliva total -No especifican si saliva es estimulada o no	-No se especifica sexo -51 a 75 años -USA	Dentición permanente	-CEO-D entre 7 a 25 -Con enfermedad periodontal -No se especifica estado de salud sistémica	
0,051 ± 0,024	Saliva total no estimulada	-No se especifica sexo -3 a 6 años -Irán	Dentición primaria	-Sin experiencia de caries -No se especifica estado de salud sistémico o periodontal	Moslemi y cols., 2015
0,003 ± 0,01	Saliva total estimulada	-Niños de 12 años -No se especifica sexo -Brasil	Dentición permanente	-Sin experiencia de caries ni enfermedades sistémicas -No se especifica estado de salud periodontal	Felizardo y cols., 2010
3,76 ± 0,83	Saliva total estimulada	-Niños entre 3 a 5 años -Niños y niñas -India	Dentición primaria	-Caries temprana de la infancia (ceo-d > 5) -Sin enfermedades sistémicas -No se especifica estado de salud periodontal	Sharma y cols., 2020

*(Tabla realizada fue elaborada en este estudio)

Hao y cols., (2009) describen una correlación positiva existiendo una diferencia estadísticamente significativa en altas concentraciones de lactoferrina salival en grupo de niños con elevada experiencia de caries, en comparación a grupos de niños sin experiencia de caries (Hao y Lin, 2009). Sharma y cols., (2020) realizaron un estudio longitudinal prospectivo en niños de India entre 3 a 5 años con caries temprana de la infancia (CTI) y un ceo-d mayor a 5, determinando una correlación con altos niveles de lactoferrina. Su estudio también demuestra los efectos del tratamiento restaurador en los niveles de lactoferrina salival, donde

reportan que en un control 3 meses después al tratamiento integral de lesiones activas se evidencia una disminución estadísticamente significativa en los niveles de lactoferrina salival (Sharma y cols., 2020). Además, Felizardo y cols., (2010) reportan en su estudio en niños brasileños de 12 años una correlación entre la presencia lactoferrina salival y valores altos de COP-D, principalmente por dientes restaurados (Felizardo y cols., 2010).

Por otra parte, Moslemi y cols. (2015) reportaron que las concentraciones de lactoferrina salival en niños iraníes entre 3 a 6 años con y sin experiencia de caries no presentan una diferencia estadísticamente significativa (Moslemi y cols., 2015).

Los estudios descritos hasta la fecha se han enfocado principalmente en analizar el efecto de lactoferrina y lisozima sobre patógenos periodontales como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* y sobre el patógeno cariogénico *S. mutans*. Sin embargo, a la fecha no existen estudios que indaguen los efectos que generan estas proteínas salivales en otros microorganismos presentes en boca como *Lacticaseibacillus* spp.

2.2. *Lacticaseibacillus* spp.

Los avances científicos han permitido estudiar y evaluar la taxonomía existente del género *Lactobacillus*, en base a la secuenciación de genomas. Es así como las 261 especies que pertenecían a este género fueron reclasificadas en 25 nuevos géneros, entre los que se encuentra *Lacticaseibacillus*. Dentro de este género se encuentran las especies *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, entre otros (Zheng y cols., 2020).

Lacticaseibacillus spp., son bacilos rectos Gram positivo, pudiendo ser cortos o largos (Figura 1), anaeróbicos facultativos, sin presentar movilidad y oxidasa negativos. Presentan un rango de temperatura para crecimiento

bacteriano que oscila entre 10 y los 40°C (Zheng y cols., 2020). Pueden estar presentes en la cavidad oral, gastrointestinal y vaginal (Saulnier y cols., 2009).

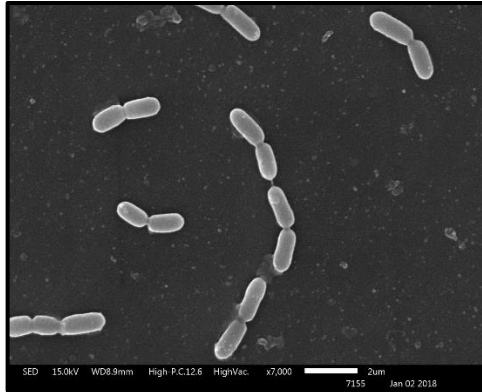


Figura 1. Fotomicrografía por Microscopía Electrónica de Barrido de *Lactocaseibacillus casei* ATCC 4646 sobre discos de vidrio embebidos con saliva. Magnificación 7000x. Imagen obtenida en Riquelme, 2018.

Estos microorganismos son homofermentativos, pueden fermentar carbohidratos como la glucosa para generar ácido láctico, principalmente el isómero óptico L (+), el cual disminuye el pH del ambiente (Zheng y cols., 2020). Este cambio es tolerado por *Lactocaseibacillus* spp. pero no por otros microorganismos vecinos, generando un ambiente inhóspito para bacterias competidoras (Caufield y cols., 2015).

Su forma de interactuar con la microbiota del hospedero humano ha permitido utilizar a *Lactocaseibacillus* spp. en otros contextos como en la elaboración de alimentos lácteos o en protocolos para tratamientos de enfermedades gastrointestinales (Tsai y cols., 2012; Zheng y cols., 2020).

Estudios *in vitro* han reportado que especies de *Lactocaseibacillus* (*casei*, *paracasei* y *rhamnosus*) usadas como probiótico puede interactuar inhibiendo microorganismos asociados a patologías orales como a *S. mutans* en relación con caries dental (Teapainsan y cols., 2011). También se ha descrito inhibición de patobiontes periodontales como *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella*

forsythia y *Fusobacterium* spp., en presencia de *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Nikawa y cols., 2011). Estos estudios permiten proponer un posible uso terapéutico de *Lacticaseibacillus* spp.

2.2.1 *Lacticaseibacillus* spp. Y CARIES DENTAL

Se ha descrito a *Lacticaseibacillus* como agente etiológico de caries dental y se ha asociado sistemáticamente con la presencia y progresión de la misma (Wolff y cols., 2013). Es así como se han encontrado elevados niveles de *Lacticaseibacillus* en muestras de dentina en dientes cariados, extraídos por pulpitis irreversible. En dicho estudio reportaron que estos valores aumentan al disminuir el pH de la dentina cariada, encontrándose mayor cantidad de *Lacticaseibacillus* en pH entre 4,5 y 5,0 (Kianoush y cols., 2014).

Se ha descrito que la primera colonización por bacterias ácido-lácticas en la cavidad oral coincide con la erupción dentaria en la infancia (Gao y cols., 2010), predominando su ubicación en fosas oclusales de dientes potencialmente retentivos (Caufield y cols., 2015). También se ha podido identificar cierta preponderancia de especies de *Lacticaseibacillus* en lesiones dentinarias en niños con caries temprana de la infancia, pudiendo aislar frecuentemente a *L. casei*, y *L. rhamnosus* (Marchant y cols., 2001). Estudios similares en niños tailandeses correlacionan la presencia del microorganismo con caries dental, encontrando una alta prevalencia de *Ligilactobacillus salivarius* y *L. casei* (Piwat y cols., 2010). Otros estudios en población adulta han descrito la presencia de *Lacticaseibacillus* spp. en lesiones de caries en dentina, destacando especies como *L. casei* y *L. rhamnosus* (Wolff y cols., 2013).

Aunque los diferentes estudios no son comparables, pues difieren en las características de los sujetos de estudio, en los sitios de muestreo (saliva, biopelícula dental, lesión de caries dentinaria, etc) y en los métodos utilizados para desarrollar el análisis, parece que existe una tendencia común en las especies de *Lacticaseibacillus* asociadas a caries dental, entre las que se encuentra *L. casei*.

Lacticaseibacillus spp. son microorganismos que se encuentran en la boca, interactuando con los tejidos y otros microorganismos. Su doble comportamiento lo hace llamativo de estudiar, sabiendo que participa en el inicio y progresión de caries dental y que en la actualidad se utiliza en productos de venta libre, como los alimentos lácteos, con el fin de favorecer la regulación de la microbiota gastrointestinal o en protocolos clínicos de tratamiento gastrointestinal.

Por otro lado, se encuentran las glicoproteínas salivales como lisozima y lactoferrina, con funciones antibacterianas, antivirales y antifúngicas, entre otras.

Dentro de este contexto, es necesario el conocimiento de la interacción de los microorganismos con moléculas y estructuras propias de la boca, que puedan incidir tanto en el inicio y progresión de patologías orales como también en la prevención de estas. Así, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto de lisozima y lactoferrina, sobre *Lacticaseibacillus casei*, evaluando su capacidad antimicrobiana sobre el crecimiento y la formación de biopelículas en este patógeno cariogénico. Para este propósito se propuso utilizar una cepa de *Lacticaseibacillus casei* aislada desde lesión de caries dentinaria, *L. casei* ATCC 4646.

3. HIPÓTESIS.

Lisozima y lactoferrina inhiben el crecimiento y la formación de biopelículas de *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646.

4. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto *in vitro* de lisozima y lactoferrina sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

5.1. Evaluar el efecto de lisozima y lactoferrina, individualmente, sobre el crecimiento bacteriano de *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646.

5.2. Evaluar el efecto de lisozima y lactoferrina, individualmente, sobre la formación de biopelículas de *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646.

6. METODOLOGÍA.

Esta investigación está adscrita al proyecto PRIODO 2021-14 (anexo 1). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional de Bioseguridad. Corresponde a un estudio de tipo experimental (analítico y prospectivo).

6.1. CEPA BACTERIANA, MEDIO Y CONDICIÓN DE CULTIVO.

Lacticaseibacillus casei obtenido de la ATCC (*L. casei* ATCC 4646) se cultivó en medio líquido MRS (Oxoid, UK) a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ a distintos tiempos, según lo requerido. La pureza del cultivo bacteriano se comprobó mediante cultivo en medio sólido MRS-agar previo a la experimentación. El crecimiento bacteriano se controló midiendo la Densidad Óptica mediante espectrofotometría a 600 nm (D.O.₆₀₀) en un lector de placas Synergy Sistem (Biotek®).

6.2. PROTEÍNAS SALIVALES

Lisozima humana (L1667, Sigma®) y lactoferrina humana (L1294, Sigma®) obtenidas comercialmente fueron preparadas en una solución de NaCl 0,9% m/v y glicerol 10% v/v, previa experimentación. Para los ensayos propuestos se utilizaron diferentes concentraciones según los niveles descritos en las tablas 1 y 2. Para ambas proteínas salivales se utilizaron las mismas concentraciones finales de 10, 20, 40, 80, 160 y 320 µg/ml.

6.3. EXPERIMENTACIÓN

6.3.1. EFECTO DE LISOZIMA Y LACTOFERRINA EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE *L. CASEI* ATCC 4646.

Para analizar el efecto de lisozima y lactoferrina sobre el crecimiento bacteriano, se realizaron curvas de crecimiento de *L. casei* ATCC 4646 en

ausencia y presencia de las proteínas salivales señaladas, a diferentes concentraciones seriadas, en una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon®). El efecto de las proteínas salivales fue determinado por separado. Se creció la bacteria previa experimentación por 10 horas hasta alcanzar la fase estacionaria temprana. Se lavaron mediante centrifugación a 4.000 g por 5 minutos a 21° C, para luego reemplazar el sobrenadante por caldo MRS fresco, dejando el cultivo a una DO₆₀₀ final de 0,5. Se inocularon los pocillos de la placa con 0,05 unidades de absorbancia final de suspensión bacteriana y cada una de las proteínas salivales a las diferentes concentraciones señaladas. El crecimiento bacteriano se midió mediante espectrofotometría a una D.O.₆₀₀ en un lector de placas Synergy System (Biotek®) donde la placa fue incubada a 37°C en condiciones aeróbicas y con agitación durante 10 horas.

6.3.2. EFECTO DE LISOZIMA Y LACTOFERRINA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *L. CASEI* ATCC 4646.

Para estudiar la formación de biopelículas en presencia de proteínas salivales, se cultivó previamente *L. casei* ATCC 4646 durante 16 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. El cultivo líquido fue centrifugado a 4.000 g durante 5 minutos a 21°C. Posteriormente fue lavado y resuspendido en medio MRS fresco a una DO₆₀₀ final de 1,0. A continuación, en una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Costar® 3526), se inoculó el cultivo a 0,1 unidades de absorbancia final, medio MRS y las proteínas a concentraciones seriadas. Se incubaron durante 5 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y sin agitación. Posteriormente se eliminaron los sobrenadantes y se lavó cada pocillo con tampón PBS estéril (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4), tres veces. Luego se agregó solución de tinción (cristal violeta 0,5% m/v) y se incubó por 30 minutos con agitación para luego ser retirado cuidadosamente. Se lavó cada pocillo con agua destilada tres veces para finalizar solubilizando las biopelículas con ácido acético 33% v/v para registrar su D.O.₅₅₀ mediante espectrofotometría en un lector de placas Synergy System (Biotek®)

6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos fueron realizados en triplicado de 3 o 4 réplicas biológicas independientes y se presentan los promedios de los resultados con sus respectivas desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó mediante el software Graphpad Prism 8.0. Para evaluar la presencia de diferencias estadísticamente significativas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se consideró la significancia estadística con $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 EFECTO DE LISOZIMA SALIVAL SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE *LACTICASEIBACILLUS CASEI* ATCC 4646.

Se analizó el crecimiento de *L. casei* ATCC 4646 durante 10 h, observándose un crecimiento positivo, que alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a las 7,5 horas de incubación (Figura 2).

Se observó un crecimiento bacteriano que varía dependiendo de la concentración de lisozima salival utilizada, siendo mayor en presencia de 10 y 80 $\mu\text{g/ml}$, representado por un mayor valor de D.O. Por otra parte, las demás concentraciones utilizadas (20, 40, 160 y 320 $\mu\text{g/ml}$) generaron un efecto negativo sobre el crecimiento bacteriano de *L. casei* ATCC 4646 (Figura 2).

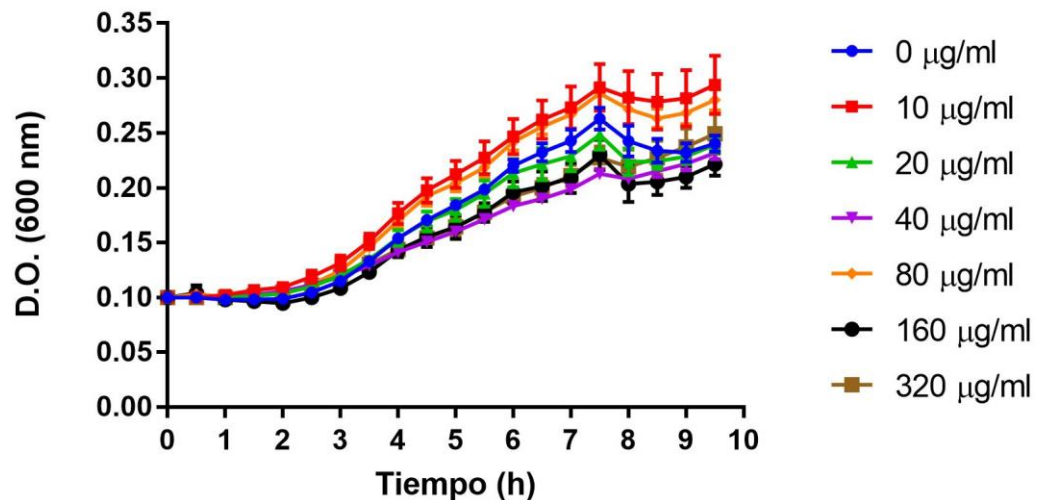


Figura 2. Curvas de crecimiento de *L. casei* ATCC 4646 y su efecto en presencia de lisozima salival. Cada curva representa el crecimiento a diferentes concentraciones de lisozima salival adicionada al medio de cultivo. Los datos representan el promedio y la D.E. de cuatro réplicas biológicas en triplicado ($n=4$).

Además, se comparó el crecimiento bacteriano de *L. casei* ATCC 4646 con diferentes concentraciones de lisozima salival a las 10 horas (Figura 3). Pese a lo

anteriormente observado, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los medios con la proteína salival y el medio control (Prueba de Kruskal Wallis, $p > 0,05$)

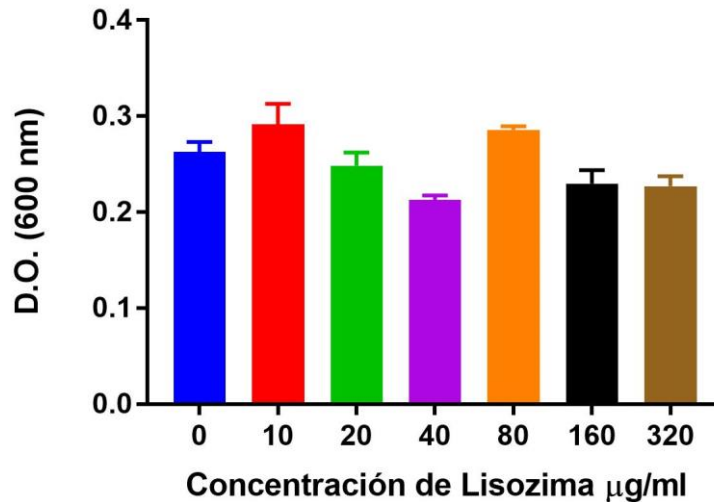


Figura 3. Crecimiento final de *L. casei* ATCC 4646 al término del crecimiento logarítmico (a las 7,5 h) y su efecto en presencia de lisozima salival. No existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de cuatro réplicas biológicas en triplicado ($n=4$).

7.2 EFECTO DE LACTOFERRINA SALIVAL SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE *LACTICASEIBACILLUS CASEI* ATCC 4646.

Se analizó el crecimiento de *L. casei* ATCC 4646 durante 10 h, observando un crecimiento positivo alcanzando la fase estacionaria aproximadamente a las 5,5 horas de incubación (Figura 4).

Se observa un crecimiento bacteriano que varía dependiendo de la concentración de lactoferrina utilizada, hallándose un mayor crecimiento en presencia de 10 y 80 µg/ml, representado por un mayor valor de D.O. Las demás concentraciones (20, 40, 160 y 320 µg/ml) generaron un efecto negativo sobre el crecimiento bacteriano en *L. casei* ATCC 4646 en comparación con la muestra control (Figura 4).

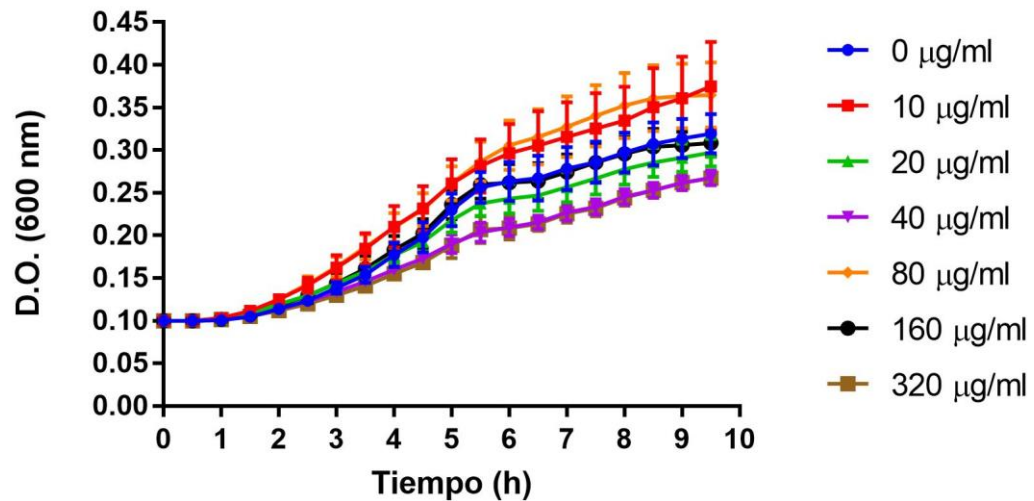


Figura 4. Curva de crecimiento de *L. casei* ATCC 4646 y su efecto en presencia de lactoferrina salival. Cada curva representa el crecimiento a diferentes concentraciones de lactoferrina salival adicionada al medio de cultivo. Los datos representan el promedio y la D.E. de cuatro réplicas biológicas en triplicado (n=4)

También se comparó el crecimiento bacteriano de *L. casei* ATCC 4646 con diferentes concentraciones de lactoferrina salival a las 10 horas (Figura 5). No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los medios con la proteína salival y el medio control (Prueba de Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

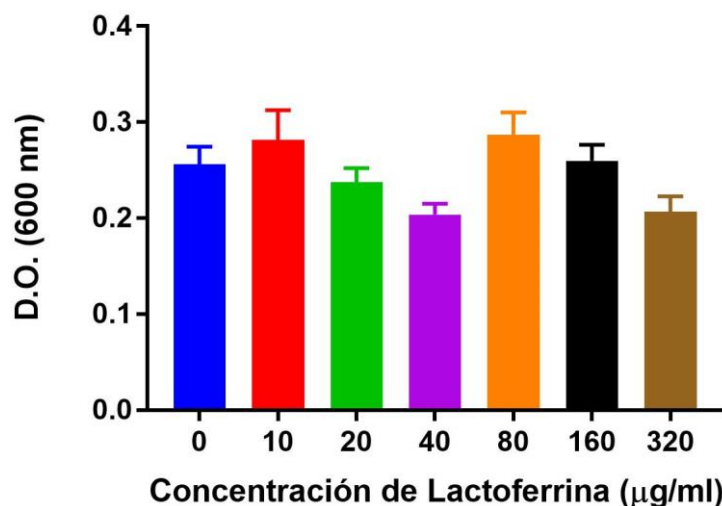


Figura 5. Crecimiento final de *L. casei* ATCC 4646 al término del crecimiento logarítmico (a las 5,5 h) y su efecto en presencia de lactoferrina salival

No existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de cuatro réplicas biológicas en triplicado (n=4).

7.3 EFECTO DE LISOZIMA SALIVAL SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *LACTICASEIBACILLUS CASEI* ATCC 4646.

Se analizó la formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646 luego de 5 días. Se observó formación de biopelícula en el medio control y en presencia de las diferentes concentraciones de lisozima salival estudiadas. No se evidenció una diferencia estadísticamente significativa (Figura 6).

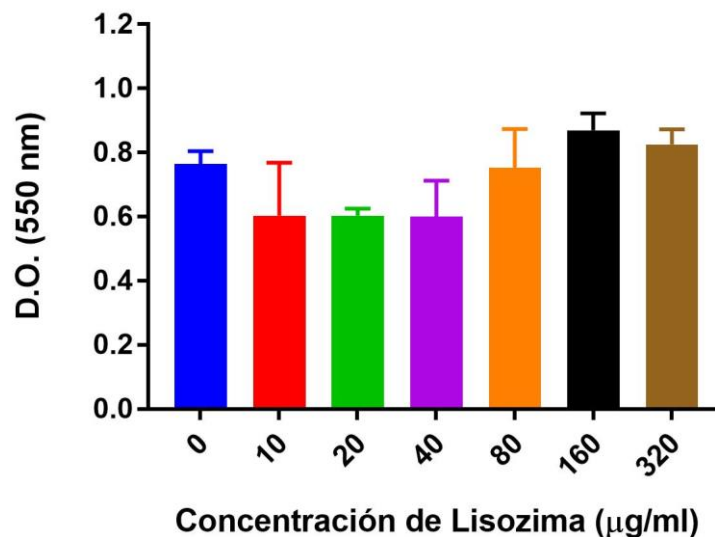


Figura 6. Efecto de lisozima salival sobre formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646 después de 5 días. No existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas biológicas en triplicado ($n=3$).

7.4 EFECTO DE LACTOFERRINA SALIVAL SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *LACTICASEIBACILLUS CASEI* ATCC 4646.

Se analizó la formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646 luego de 5 días en presencia de las diferentes concentraciones de lactoferrina salival estudiadas. Se observó formación de biopelícula en el medio control. No se evidenció una diferencia estadísticamente significativa (Figura 7).

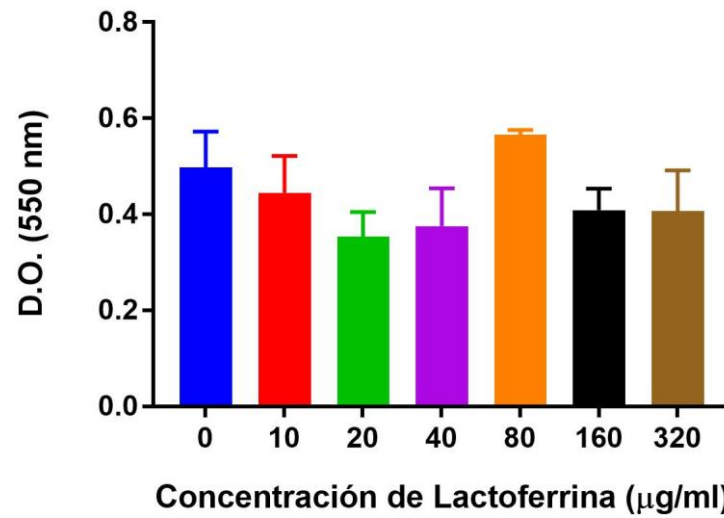


Figura 7. Efecto de lactoferrina salival sobre formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646 después de 5 días. No existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas biológicas en triplicado ($n=3$).

8. DISCUSIÓN

Basado en los antecedentes de la literatura, en este estudio *in vitro* se propuso que lisozima y lactoferrina inhiben el crecimiento y la formación de biopelículas de *Lactocaseibacillus casei* ATCC 4646. Sin embargo, en las condiciones analizadas, no se evidenció un efecto estadísticamente significativo, por lo que se rechaza la hipótesis.

Para poder realizar este estudio, se analizó exhaustivamente en la literatura las concentraciones fisiológicas de lisozima y lactoferrina salival para determinar las concentraciones a utilizar. Sin embargo, no fue posible determinar un consenso ya que la composición proteica salival varía sustancialmente entre individuos, edad, sexo y presencia/ausencia de salud oral o sistémica (Marsh y cols., 2015; Quintana y cols., 2009; Preza y cols., 2009; Ambatipudi y cols., 2009; Wang y cols., 2018) o incluso en el propio individuo, dependiendo si las moléculas están concentradas en superficie dental, mucosas, coagregadas con mucinas o incluso suspendidas uniéndose entre sí en micelas salivales (Marsh y cols., 2015). Debido a esto se utilizó un rango amplio de concentración entre 0 a 320 µg/ml, de cada proteína en los ensayos

Crecimiento bacteriano

En este estudio se determinó que lisozima y lactoferrina no poseen un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento aeróbico de *L. casei* ATCC 4646. Estos resultados se asemejan a los resultados descritos por Köll y colaboradores (2008) quienes evaluaron el efecto de lisozima en el crecimiento bacteriano de bacterias ácido-lácticas, con el propósito de poder utilizar estos microorganismos como probióticos. En su estudio demostraron que lisozima a concentraciones entre 0,2 a 10 mg/ml no produjo un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de especies como *L. paracasei* y *L. rhamnosus* (Köll y cols., 2008). Cabe destacar que las concentraciones de lisozima utilizadas son mucho mayores a las analizadas en este trabajo y también son mucho mayores a

las encontradas en saliva humana.

Por el contrario, existen otros estudios que difieren con los resultados obtenidos en este estudio. Krzyściak y colaboradores (2015), reportaron que lisozima 54,4 µg/ml afecta negativamente el crecimiento bacteriano de *S. mutans* ATCC 25175 y *L. rhamnosus* ATCC 7469. También se encontró que en presencia de lisozima 54,4 µg/ml combinado con 5-histatina 27,2 µg/ml se generan una inhibición en el crecimiento bacteriano, produciendo un efecto sinérgico (Krzyściak y cols., 2015). De Andrade y colaboradores (2014) estudiaron el efecto bacteriostático y bactericida de lisozima y lactoferrina sobre *L. rhamnosus* ATCC 7469 y *S. mutans* ATCC 25175, determinando la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) y CBM (Concentración bactericida mínima) en atmósfera de CO₂ (de Andrade y cols., 2014). En dicho estudio encontraron que lisozima producía un efecto bacteriostático sobre *L. rhamnosus* ATCC 7469 a una concentración de 43,1 µg/ml y un efecto bactericida a una concentración de 50,3 µg/ml. También encontraron que lisozima produce un efecto bacteriostático sobre *S. mutans* ATCC 25175 a 58,7 µg/ml y un efecto bactericida a una concentración de 68,5 µg/ml. Por otra parte, de Andrade y colaboradores no evidenciaron un efecto bacteriostático ni bactericida de lactoferrina sobre *L. rhamnosus* ATCC 7469 y *S. mutans* ATCC 25175, ni en concentraciones hasta 200 µg/ml.

A la fecha no se han reportado otros estudios del efecto de lactoferrina sobre bacterias Gram positivo de la cavidad oral. En relación con otras bacterias orales, Aguilera y colaboradores (1998) evaluaron el efecto de lactoferrina salival en el crecimiento bacteriano de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *P. nigrescens* a una concentración única de 2 mg/ml, sin hallar un efecto significativo (Aguilera y cols., 1998). Wakabayashi y colaboradores (2009) también evaluaron el efecto de lactoferrina, humana y bovina, en el crecimiento de patobiontes periodontales como *P. gingivalis* y *P. intermedia*, reportando un efecto inhibitorio en presencia de concentraciones seriadas entre 0,13 y 8 mg/ml. Dicho efecto disminuyó después de las 8 h de incubación (Wakabayashi y cols., 2009).

La mayoría de los estudios expuestos anteriormente no se condicen con los resultados obtenidos del efecto de lisozima en este estudio, pero si se condicen con los resultados obtenidos del efecto de lactoferrina sobre otros microorganismos orales.

No se encontraron estudios relacionados con el efecto de estas proteínas salivales sobre el crecimiento bacteriano de *L. casei*.

Formación de biopelículas

En este estudio *in vitro* se determinó que la presencia de concentraciones seriadas de lisozima o lactoferrina no poseen efecto estadísticamente significativo sobre la formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646.

Estos resultados difieren con lo descrito por Krzyściak y colaboradores (2015), quienes estudiaron la formación de biopelículas de *S. mutans* ATCC 25175 y *L. rhamnosus* ATCC 7469 en presencia de lisozima e histatina, de manera individual y combinadas. En dicho estudio, lisozima mostró un efecto inhibitorio estadísticamente significativo en la formación de biopelículas en monocultivos y co-cultivos de *S. mutans* y *L. rhamnosus*. Se determinó que la mayor actividad inhibidora en la formación de biopelículas se produce a una concentración de 54,4 µg/ml a las 60 h de incubación para mono cultivos y a las 48 h de incubación en co-cultivos (Krzyściak y cols., 2015).

No se encontraron otros estudios que analizaran el efecto de lisozima sobre la formación de biopelícula de *L. casei*.

En relación con lactoferrina, no se encontraron estudios que evaluaran el efecto de dicha proteína en la formación de biopelículas de *L. casei*, pero si se encontraron estudios *in vitro* con otras bacterias Gram positivo. Berlutti y cols., (2004), estudiaron el efecto *in vitro* de lactoferrina bovina sobre la capacidad de adherencia y formación de biopelículas de *S. mutans* en suspensión y adherida a

superficies abióticas. Ellos reportaron que la presencia de holo-lactoferrina bovina disminuye el efecto de agregación bacteriana y formación de biopelículas de *S. mutans* (Berlutti y cols., 2004). Dicho estudio no se condice con los resultados obtenidos en este trabajo para *L. casei* ATCC 4646.

Con respecto a otras bacterias orales, Wakabayashi y colaboradores (2009) evaluaron el efecto de lactoferrina en la formación de biopelículas de *P. gingivalis* y *P. intermedia*. Reportaron para *P. gingivalis* un efecto inhibitorio en presencia de lactoferrina humana o bovina a concentraciones seriadas desde 8 µg/ml a 2 mg/ml. Con respecto a *P. intermedia* reportaron un efecto inhibitorio desde concentraciones de 0,031 mg/ml de lactoferrina bovina y desde concentraciones de 0,13 mg/ml de lactoferrina humana. En ambas bacterias existió un efecto inhibitorio dosis dependiente (Wakabayashi y cols., 2009).

Cabe mencionar que en este estudio se utilizó lactoferrina en su forma holo-lactoferrina y no apo-lactoferrina, pues el mecanismo de acción de apo-lactoferrina como quelante de hierro no sería eficiente sobre *Lactocaseibacillus* ya que se ha descrito que dicha bacteria requiere niveles de hierro muy bajos para poder vivir (Weinberg, 1997).

Posibles mecanismos de resistencia a las proteínas salivales

Se han descrito mecanismos que favorecen la resistencia de *Streptococcus* spp., al efecto antibacteriano de lisozima. Uno de estos mecanismos es el aumento de la expresión de enzimas modificantes del peptidoglicano, como la peptidoglican N-acetilglucosamina deacetilasa (PgdA) y la peptidoglican O-acetiltransferasa (OatA) (Wichgers y cols., 2012). Ambas enzimas modifican directamente las estructuras de N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina, reduciendo la afinidad de lisozima por la capa de peptidoglican.

Al realizar una búsqueda en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) de los genes y proteínas

disponibles de *Lacticaseibacillus casei*, se encontró el reporte de 36 cepas poseedoras del gen *pgdA*. No se encontraron reportes de la presencia del gen *oatA* en *L. casei*, sin embargo, se encontró que 129 cepas de *Lacticaseibacillus* spp, incluyendo a *paracasei* y *rhamnosus* presentan el gen *oatA* (datos no mostrados).

Lo anteriormente descrito nos hace especular que *Lacticaseibacillus* spp. podría presentar mecanismos de resistencia a lisozima mediante la expresión de enzimas modificantes del peptidoglicano, similares a lo reportado para *Streptococcus* spp. Se requieren realizar futuros estudios para validar esta hipótesis.

Por otra parte, la ausencia de un efecto de las proteínas salivales estudiadas sobre *L. casei* podría explicarse por la coexistencia que presentan estas bacterias con lisozima y lactoferrina durante el desarrollo de la vida del ser humano.

La interacción de microorganismos y su colonización en la cavidad oral parte desde el nacimiento. Se ha visto que menos del 25% de los recién nacidos por parto natural adquirieron bacterias ácido-lácticas por vía vaginal y después de un mes dichas bacterias son reemplazadas por bacterias ácido-lácticas presentes en la leche materna (Matsumiya y cols., 2002).

Dentro de la composición de la leche materna humana podemos encontrar microorganismos como *Lacticaseibacillus* donde lograron aislar a *L. rhamnosus* del 8,13% de las muestras y a *L. casei* del 4,38% de las muestras (Soto y cols., 2014).

Además, en la leche materna podemos encontrar proteínas como lactoferrina, la cual es la segunda proteína más abundante. Las concentraciones de lactoferrina pueden ser de 2 - 4 µg/mL en leche (Lyons y cols., 2020).

La coexistencia de *Lactocaseibacillus* spp. y lactoferrina en la leche materna, nos permite inferir que estos microorganismos han desarrollado mecanismos para poder tolerar a proteínas antimicrobianas propias del sistema inmune innato. Esto permitiría explicar el hecho de que *L. casei* no se vea afectado en el crecimiento y en la formación de biopelículas en presencia de esta proteína.

Aplicación clínica del estudio:

Manufactura de pastas dentales con proteínas salivales

En las últimas décadas se ha estudiado el uso de pastas dentales u otros elementos de uso oral con presencia de proteínas salivales para tratar patologías orales como caries dental. Dentro de las pastas estudiadas está BioXtra®, que posee dentro de sus principios activos proteínas como lisozima, lactoferrina y lactoperoxidasa.

Hatti y colaboradores (2007) compararon el efecto de BioXtra® y de pastas fluoradas en la reducción del índice de placa bacteriana y en el recuento de bacterias orales, posterior a la aplicación del producto como un ungüento sobre la superficie dental. En dicho estudio encontraron un menor recuento de bacterias orales desde biopelículas en personas que usaron la pasta BioXtra® y una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo que usó pasta convencional. (Hatti y cols., 2007). En otro estudio demostraron que la pasta dental BioXtra® puede disminuir el recuento de unidades formadoras de colonias en saliva de microorganismos cariogénicos como *S. mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, habiendo sido usada en niños con caries temprana de la infancia (Gudipani y cols., 2014).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, podemos inferir que el uso de elementos de higiene oral con lisozima o lactoferrina, como pastas dentales mejoradas, no favorecerían la disminución del crecimiento ni formación de biopelículas de *Lactocaseibacillus casei*. Aun así, entendiendo a la caries dental como una enfermedad crónica multifactorial y reforzando la idea de que el control

químico-mecánico de la biopelícula sigue siendo el tratamiento “gold standard”, el uso de dichas pastas sería una forma efectiva para la prevención de caries dental y la mantención en salud, siempre y cuando la persona se encuentre en salud oral.

Conocer los efectos de los componentes salivales sobre las diferentes especies bacterianas presentes en boca permitirá la elaboración y/o perfeccionamiento de productos orales que puedan ser utilizados en gran escala como tratamientos coadyuvantes, junto al cepillado dental, con el objetivo reforzar la mantención de la salud oral y la integridad de los tejidos orales. Se sugiere realizar más estudios *in vitro*, para profundizar en la investigación.

9. CONCLUSIONES

El crecimiento y la formación de biopelículas de *Lactocaseibacillus casei* ATCC 4646 *in vitro* no se ve afectado por la presencia de lisozima o lactoferrina.

10. REFERENCIAS

- Aguilera, O., Andrés, M., Heath, J., Fierro, J., & Douglas, C. (1998). Evaluation of the antimicrobial effect of lactoferrin on *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 21(1), 29-36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1998.tb01146.x>
- Ambatipudi, K., Lu, B., Hagen, F., Melvin, J., & Yates, J. (2009). Quantitative Analysis of Age Specific Variation in the Abundance of Human Female Parotid Salivary Proteins. *Journal Of Proteome Research*, 8(11), 5093-5102. doi: 10.1021/pr900478h
- Amerongen, A., & Veerman, E. (2002). Saliva the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12-22. doi: 10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x
- Amerongen, N., Oderkerk, C., & Driessen, A. (1987). Role of Mucins from Human Whole Saliva in the Protection of Tooth Enamel against Demineralization in vitro. *Caries Research*, 21(4), 297-309. doi: 10.1159/000261033
- Arnold, R., Russell, J., Champion, W., Brewer, M., & Gauthier, J. (1982). Bactericidal Activity of Human Lactoferrin: Differentiation from the Stasis of Iron Deprivation. *Infection And Immunity*, 35(3), 792-799. <https://doi.org/10.1128/iai.35.3.792-799.1982>
- Arslan, S., Leung, K., & Wu, C. (2009). The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiology And Immunology*, 24(5), 411-416. doi: 10.1111/j.1399-302x.2009.00537.x
- Berlutti, F., Maria, A., Pietro, B., Clara, M., Petrucca, A., Antonini, G., & Valenti, P. (2004). Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals*, 17(3), 271-278. <https://doi.org/10.1023/b:biom.0000027704.53859.d3>

Brown, F., Mackie, A., He, Q., Branch, A., & Sarkar, A. (2021). Protein–saliva interactions: a systematic review. *Food & Function*, 12(8), 3324-3351. doi: 10.1039/d0fo03180a

Caufield, P., Schön, C., Saraithong, P., Li, Y., & Argimón, S. (2015). Oral Lactobacilli and Dental Caries. *Journal Of Dental Research*, 94(9_suppl), 110S-118S. <https://doi.org/10.1177/0022034515576052>

Cole, M., Hsu, S., Baum, B., Bowen, W., Sierra, L., Aquirre, M., & Gillespie, G. (1981). Specific and nonspecific immune factors in dental plaque fluid and saliva from young and old populations. *Infection And Immunity*, 31(3), 998-1002. doi: 10.1128/iai.31.3.998-1002.1981

de Andrade, F. B., de Oliveira, J. C., Yoshie, M. T., Guimarães, B. M., Gonçalves, R. B., & Schwarcz, W. D. (2014). Antimicrobial activity and synergism of lactoferrin and lysozyme against cariogenic microorganisms. *Brazilian dental journal*, 25(2), 165–169. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302257>

Dodds, M., Johnson, D., & Yeh, C. (2005). Health benefits of saliva: a review. *Journal Of Dentistry*, 33(3), 223-233. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009

Drago, M. (2006). Actividades antibacterianas de lactoferrina. *Enf Infec Microbiol*, 26(2), 58-63.

Felizardo, K., Gonçalves, R., Schwarcz, W., Poli-Frederico, R., Maciel, S., & Andrade, F. (2010). An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme and their association with caries experience and activity. *Revista Odonto Ciência (Online)*, 25(4), 344-349. doi: 10.1590/s1980-65232010000400004

Ferraboschi, P., Ciceri, S., & Grisenti, P. (2021). Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics*, 10(12), 1534. doi: 10.3390/antibiotics10121534

Gálvez-Iriqui, A., Plascencia-Jatomea, M., & Bautista-Baños, S. (2020). Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications

on the control of pathogenic microorganisms. *Revista Mexicana De Fitopatología, Mexican Journal Of Phytopathology*, 38(3). doi: 10.18781/r.mex.fit.2005-6

Gao, X., Jiang, S., Koh, D., & Hsu, C. (2015). Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology 2000*, 70(1), 128-141. doi: 10.1111/prd.12100

Gibbons, R., & Hay, D. (1989). Adsorbed Salivary Acidic Proline-rich Proteins Contribute to the Adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to Apatitic Surfaces. *Journal Of Dental Research*, 68(9), 1303-1307. doi: 10.1177/00220345890680090201

Gudipaneni, R. K., Kumar R, V., G, J., Peddengatagari, S., & Duddu, Y. (2014). Short term comparative evaluation of antimicrobial efficacy of tooth paste containing lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase in children with severe early childhood caries: a clinical study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8(4), ZC18–ZC20. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8161.4232>

Hao, G. F., & Lin, H. C. (2009). *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology*, 44(2), 82–84.

Hatti, S., Ravindra, S., Satpathy, A., Kulkarni, R., & Parande, M. (2007). Biofilm inhibition and antimicrobial activity of a dentifrice containing salivary substitutes. *International Journal Of Dental Hygiene*, 5(4), 218-224. doi: 10.1111/j.1601-5037.2007.00249.x

Hay, D., Smith, D., Schluckebier, S., & Moreno, E. (1984). Basic Biological Sciences Relationship between Concentration of Human Salivary Statherin and Inhibition of Calcium Phosphate Precipitation in Stimulated Human Parotid Saliva. *Journal Of Dental Research*, 63(6), 857-863. doi: 10.1177/00220345840630060901

Jentsch, H., Beetke, E., & Göcke, R. (2004). Salivary analyses and caries increment over 4 years: an approach by cluster analysis. *Clinical Oral Investigations*, 8(3). <https://doi.org/10.1007/s00784-004-0263-6>

Kauffman, D., & Keller, P. (1979). The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. *Archives Of Oral Biology*, 24(4), 249-256. doi: 10.1016/0003-9969(79)90085-2

Kho, H., Vacca Smith, A., Koo, H., Scott-Anne, K., & Bowen, W. (2005). Interactions of *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase B with Lysozyme in Solution and on the Surface of Hydroxyapatite. *Caries Research*, 39(5), 411-416. doi: 10.1159/000086849

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(3), e92940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092940>

Kmiliauskis, M., Palmeira, P., Arslanian, C., Pontes, G., Costa-Carvalho, B., Jacob, C., & Carneiro-Sampaio, M. (2005). Salivary lysozyme levels in patients with primary immunodeficiencies. *Allergologia Et Immunopathologia*, 33(2), 65-68. doi: 10.1157/13072915

Köll, P., Mändar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M., & Hammarström, L. (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral microbiology and immunology*, 23(2), 139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00402.x>

Koll-Klais, P., Mandar, R., Leibur, E., Marcotte, H., Hammarstrom, L., & Mikelsaar, M. (2005). Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiology And Immunology*, 20(6), 354-361. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2005.00239.x>

Krzyściak, W., Jurczak, A., Piątkowski, J., Kościelniak, D., Gregorczyk-Maga, I., Kołodziej, I., Papież, M. A., & Olczak-Kowalczyk, D. (2015). Effect of histatin-5 and lysozyme on the ability of *Streptococcus mutans* to form biofilms in in vitro conditions. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 69, 1056–1066.

Lenander-Lumikari, M., & Loimaranta, V. (2000). Saliva and Dental Caries. *Advances In Dental Research*, 14(1), 40-47. doi: 10.1177/08959374000140010601

Lynge Pedersen, A., & Belstrøm, D. (2019). The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal Of Dentistry*, 80, S3-S12. doi: 10.1016/j.jdent.2018.08.010

Lyons, K., Ryan, C., Dempsey, E., Ross, R., & Stanton, C. (2020). Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients*, 12(4), 1039. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>

Marchant, S., Brailsford, S., Twomey, A., Roberts, G., & Beighton, D. (2001). The Predominant Microflora of Nursing Caries Lesions. *Caries Research*, 35(6), 397-406. <https://doi.org/10.1159/000047482>

Marsh, P., Do, T., Beighton, D., & Devine, D. (2015). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), 80-92. doi: 10.1111/prd.12098

Mass, E., Gadoth, N., Harell, D., & Wolff, A. (2002). Can salivary composition and high flow rate explain the low caries rate in children with familial dysautonomia?. *Pediatric dentistry*, 24(6), 581–586.

Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K., & Kato, H. (2002). Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal Of Infection And Chemotherapy*, 8(1), 43-49. <https://doi.org/10.1007/s101560200005>

Moslemi, M., Sattari, M., Kooshki, F., Fotuhi, F., Modarresi, N., Khalili Sadrabad, Z., & Shadkar, M. (2015). Relationship of Salivary Lactoferrin and Lysozyme Concentrations with Early Childhood Caries. *Journal Of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 9(2), 109-114. doi: 10.15171/joddd.2015.022

Nikawa, H., Tomiyama, Y., Hiramatsu, M., Yushita, K., Takamoto, Y., Ishi, H., Mimura, S., Hiyama, A., Sasahara, H., Kawahara, K., Makihira, S., Satoda, T.,

Takemoto, T., Murata, H., Mine, Y., & Taji, T. (2011). Bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* L8020 decreases the oral carriage of mutans streptococci and the burden of periodontal pathogens. *Journal of investigative and clinical dentistry*, 2(3), 187–196. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2011.00056.x>

Piwat, S., Teanpaisan, R., Thitasomakul, S., Thearmontree, A., & Dahlén, G. (2010). *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Molecular oral microbiology*, 25(2), 157–164. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2009.00556.x>

Preza, D., Thiede, B., Olsen, I., & Grinde, B. (2009). The proteome of the human parotid gland secretion in elderly with and without root caries. *Acta Odontologica Scandinavica*, 67(3), 161-169. doi: 10.1080/00016350902751545

Quintana, M., Palicki, O., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chambon, C., Salles, C., & Morzel, M. (2009). Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. *Journal Of Proteomics*, 72(5), 822-830. doi: 10.1016/j.jprot.2009.05.004

Riquelme, N. (2018) Efecto de *Bifidobacterium dentium* sobre *Lactobacillus casei* a través de *quorum sensing*, mediado por autoinductor-2. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista, U de Chile.

Rudney, J., & Smith, Q. (1985). Relationships between levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase, and secretory immunoglobulin A in stimulated parotid saliva. *Infection And Immunity*, 49(3), 469-475. doi: 10.1128/iai.49.3.469-475.1985

Sánchez, G., Miozza, V., Delgado, A., & Busch, L. (2010). Determination of salivary levels of mucin and amylase in chronic periodontitis patients. *Journal Of Periodontal Research*, 46(2), 221-227. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01332.x

Saulnier, D., Kolida, S., & Gibson, G. (2009). Microbiology of the Human Intestinal Tract and Approaches for Its Dietary Modulation. *Current*

Pharmaceutical Design, 15(13), 1403-1414.
<https://doi.org/10.2174/138161209788168128>

Sharma, A., Subramaniam, P., & Moiden, S. (2017). Analysis of salivary IgA, amylase, lactoferrin, and lysozyme before and after comprehensive dental treatment in children: A prospective study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 8(4), 526. doi: 10.4103/ccd.ccd_103_17

Sikorska, M., Mielnik-Blaszczak, M., & Kapeć, E. (2002). The relationship between the levels of SigA, lactoferrin and α 1proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. *Oral Microbiology And Immunology*, 17(5), 272-276. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2002.170502.x>

Soto, A., Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J., & Fernández, L. (2014). Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk. *Journal Of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 59(1), 78-88. <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000000347>

Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., & Dorland, L. et al. (1982). Primary Structure of the Glycans from Human Lactotransferrin. *European Journal Of Biochemistry*, 121(2), 413-419. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05803.x>

Stuchell, R., & Mandel, I. (1983). A Comparative Study of Salivary Lysozyme in Caries-resistant and Caries-susceptible Adults. *Journal Of Dental Research*, 62(5), 552-554. doi: 10.1177/00220345830620050701

Sun, H., Chen, Y., Zou, X., Li, Q., Li, H., & Shu, Y. et al. (2016). Salivary Secretory Immunoglobulin (SIgA) and Lysozyme in Malignant Tumor Patients. *Biomed Research International*, 2016, 1-6. doi: 10.1155/2016/8701423

Teanpaisan, R., Piwat, S., & Dahlén, G. (2011). Inhibitory effect of oral Lactobacillus against oral pathogens. *Letters In Applied Microbiology*, 53(4), 452-459. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2011.03132.x>

Tsai, Y., Cheng, P., & Pan, T. (2012). The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Applied*

Microbiology And Biotechnology, 96(4), 853-862.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4407-3>

Turner, G. A., Saxton, C. A., & Svatun, B. (1991). Concentration of antimicrobial proteins in human saliva. The effect of six months use of an antiplaque dentifrice on levels of antimicrobial proteins in unstimulated saliva from 102 adults. *Journal de biologie buccale*, 19(4), 267–270.

Visca, P., Berlutti, F., Vittorioso, P., Dalmastri, C., Thaller, M., & Valenti, P. (1989). Growth and adsorption of *Streptococcus mutans* 6715-13 to hydroxyapatite in the presence of lactoferrin. *Medical Microbiology And Immunology*, 178(2). <https://doi.org/10.1007/bf00203302>

Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Kobayashi, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., & Yoshie, H. (2009). Inhibitory Effects of Lactoferrin on Growth and Biofilm Formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 53(8), 3308-3316.
<https://doi.org/10.1128/aac.01688-08>

Wang, K., Zhou, X., Li, W., & Zhang, L. (2019). Human salivary proteins and their peptidomimetics: Values of function, early diagnosis, and therapeutic potential in combating dental caries. *Archives Of Oral Biology*, 99, 31-42. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.12.009

Weinberg, E. (1997). The Lactobacillus Anomaly: Total Iron Abstinence. *Perspectives In Biology And Medicine*, 40(4), 578-583.
<https://doi.org/10.1353/pbm.1997.0072>

Wichgers Schreur, P. J., van Weeghel, C., Rebel, J. M., Smits, M. A., van Putten, J. P., & Smith, H. E. (2012). Lysozyme resistance in *Streptococcus suis* is highly variable and multifactorial. *PloS one*, 7(4), e36281.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036281>

Wolff, D., Frese, C., Maier-Kraus, T., Krueger, T., & Wolff, B. (2012). Bacterial Biofilm Composition in Caries and Caries-Free Subjects. *Caries Research*, 47(1), 69-77. <https://doi.org/10.1159/000344022>

Yeh, C., Dodds, M., Zuo, P., & Johnson, D. (1997). A population-based study of salivary lysozyme concentrations and candidal counts. *Archives Of Oral Biology*, 42(1), 25-31. doi: 10.1016/s0003-9969(96)00104-5

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., & Mattarelli, P. et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

11. ANEXOS

11.1 ANEXO 1. CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRIODO



CARTA – CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRI-ODO

Santiago, 24 de agosto de 2021

Mat.: Asigna Código DIFO: 2021/14

Dr. Claudia Lefimil Puente

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

PRESENTE

Estimada Dra. Lefimil:

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

Este Proyecto cuenta con:

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

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

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

Deseándole el mayor de los éxitos, se despide cordialmente,



DR. ALFREDO MOLINA BERRÍOS

Director de Investigación

Facultad de Odontología - Universidad de Chile

AMB/rcm.