



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

**“INHIBICIÓN DEL SISTEMA *QUORUM SENSING* EN *STREPTOCOCCUS*
MUTANS COMO ESTRATEGIA PREVENTIVA DE CARIES DENTAL”**

Natalia Solange Figueroa Rudaya

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REVISIÓN SISTEMÁTICA CUALITATIVA

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Rafael Contador Cotroneo

Adscrito a Proyecto PRIODO 2020-002

Santiago – Chile

2021



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**“INHIBICIÓN DEL SISTEMA *QUORUM SENSING* EN *STREPTOCOCCUS
MUTANS* COMO ESTRATEGIA PREVENTIVA DE CARIES DENTAL”**

Natalia Solange Figueroa Rudaya

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REVISIÓN SISTEMÁTICA CUALITATIVA

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Rafael Contador Cotroneo

Adscrito a Proyecto PRIODO 2020-002

Santiago – Chile

2021

AGRADECIMIENTOS

A mi casa de estudios, Universidad de Chile, por las inagotables oportunidades de crecimiento profesional y personal que me entrego a lo largo de este proceso.

A mi familia por el apoyo y entregarme el privilegio de poder estudiar una carrera universitaria.

A mi tutora, Claudia Lefimil, por permitirme realizar este trabajo con ella y acompañarme durante todo el proceso. Además, agradecerle por su apoyo y guía en otras actividades en mi paso por la facultad como el programa TIP y su apoyo como DAE.

A mi cotutor, Rafael Contador, con el que fuimos compañeros en el equipo CEO 2015 y que hoy me acompaña en el cierre de este proceso.

Al proyecto PRIODO 2020-002 por entregarme la oportunidad de realizar este trabajo.

A los equipos CEO 2015, 2016 y especialmente al del 2017 por enseñarme tanto, dar espacio a mi desarrollo en otros aspectos, por la compañía y ser siempre respaldo de las decisiones colectivas. Junto con ellos también agradecerle a la Tía Toña, pilar importante durante esos años, contención y cariño.

A mis excompañeros de militancia de la extinta Unión Nacional Estudiantil por entregarme herramientas que jamás pensé tener en la universidad y por enseñarme a vivir con esperanza de que nuestro país puede ser un lugar más justo desde el trabajo colectivo y el respeto.

Finalmente, agradecer a lo que considero una de las cosas más importante en mi vida, mis amigos, especialmente el “darle” que ha sido mi maestro en tantas oportunidades, sostén importante de mi vida y lo mejor que me ha pasado en mi paso por la universidad. Gracias por permitirnos crecer juntos, por el amor y cariño incondicional que me han entregado.

INDICE

1. RESUMEN	2
2. MARCO TEÓRICO	3
Enfermedad de Caries	3
Hipótesis Extendida de Placa Ecológica.....	5
<i>Streptococcus mutans</i> y Caries Dental.....	6
Interacciones Bacterianas en la Biopelícula Dental	7
<i>Quorum Sensing: Streptococcus mutans</i>	8
Inhibición del <i>quorum sensing</i> como estrategia antibacteriana.....	13
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
4. OBJETIVO GENERAL	14
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
6. METODOLOGÍA	15
7. RESULTADOS	16
Resultados de búsqueda bibliográfica.....	16
Inhibidores del sistema ComABCDE.....	19
Inhibidores del sistema LuxS en <i>S. mutans</i>	22
Uso intraoral de inhibidores estudiados.....	23
8. DISCUSIÓN	25
Inhibición de <i>quorum sensing</i>	25
Inhibición de la vía ComABCDE.....	25
Inhibición vía LuxS.....	27
Potencial uso intraoral de los inhibidores.....	29
9. CONCLUSIONES	31
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
11. ANEXOS	43

1. RESUMEN

Marco teórico: La caries dental se puede definir como una enfermedad crónica mediada por una biopelícula, modulada por azúcares, multifactorial, no transmisible y dinámica, que conduce a la desmineralización de los tejidos duros del diente. Si bien se trata de una enfermedad mediada por biopelículas, *Streptococcus mutans* ha sido consistentemente asociado a caries dental. *S. mutans* se ha caracterizado como colonizador de la biopelícula asociada a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación con la generación de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de los carbohidratos. El *quorum sensing* es un proceso de comunicación bacteriana que modula la expresión génica de toda la población incluyendo la potenciación de los mecanismos de patogenicidad (capacidad de formar biopelículas, adhesión a la superficie dental, producción y tolerancia a ácidos, competencia, etc.). Dentro de las vías de *quorum sensing* de *S. mutans* destacan la vía ComABCDE y la vía LuxS, por este motivo parece relevante poder interferir en la señalización de *S. mutans* y así modular la expresión génica de sus mecanismos de patogenicidad.

Objetivo general: Determinar, mediante una revisión de la literatura, potenciales moléculas de uso intraoral que interfieran en los mecanismos de *quorum sensing* en *Streptococcus mutans*.

Metodología: Este trabajo corresponde a una revisión sistemática cualitativa. Se utilizaron los motores de búsqueda de Pubmed, Web Of Science (WOS), Scopus y Scielo con los términos: "INHIBITION", "QUORUM SENSING", "*STREPTOCOCCUS MUTANS*", "QUORUM QUENCHING" y los operadores booleanos "AND" y "Y". Se tabularon los resultados considerando las variables necesarias.

Resultados: Se seleccionaron un total de 18 artículos en los cuales se presentaba un total de 17 inhibidores. Dentro de los mecanismos de acción se destacan la inhibición del propéptido ComC en la vía ComABCDE y la inhibición de la producción de AI-2.

Conclusión: DMTU parece ser el inhibidor más prometedor en la actualidad debido a que ya cuenta con experimentación *in vivo* con resultados favorables. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar inhibidores de *quorum sensing* y tengan potencial uso intraoral.

2. MARCO TEÓRICO

Enfermedad de Caries

La caries dental se puede definir como una enfermedad crónica mediada por una biopelícula, modulada por azúcares, multifactorial, no transmisible y dinámica, que conduce a la desmineralización de los tejidos duros del diente. Está determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. Como consecuencia de este proceso, se desarrolla una lesión de caries (Pitts N. y cols., 2017). La lesión de caries es el signo clínico de enfermedad de caries, la cual es consecuencia de la disolución química de la superficie dentaria causada por eventos metabólicos que ocurren en la biopelícula que cubre el área afectada (Fejerskov O. y Kidd E., 2008). Se pueden clasificar de acuerdo a su ubicación anatómica en el diente (superficie coronal o raíz / cemento), su gravedad (no cavitado, cavitado), profundidad de penetración en el tejido (esmalte, dentina, pulpa), y su estado de actividad (activo, inactivo) (Machiulskiene V. y cols., 2020). Si esta enfermedad no se atiende oportunamente, afecta la salud general y la calidad de vida de los individuos de todas las edades (Palomer L., 2006). Con una prevalencia del 40% a nivel mundial la Federación Dental Internacional (FDI) la define como la enfermedad crónica más común y la Organización Mundial de la Salud (OMS), por su parte, la cataloga como una pandemia (FDI, 2015; Petersen P., 2003). Según datos del Ministerio de Salud, la prevalencia de caries en Chile es de 70,3% a los 6 años, 62,7% a los 12 años y cerca del 100% en la población adulta (MINSAL, 2011).

La caries dental se produce por la interacción entre la superficie del diente, la biopelícula bacteriana dental y la presencia de azúcares en la dieta. Las bacterias de la biopelícula metabolizan los azúcares consumidos en la dieta, produciendo ácidos, los cuales generan una selección de microorganismos acidogénicos (productores de ácido) y acidúricos (resistentes y funcionales en un ambiente ácido). Esto genera, como consecuencia, cambios en el balance natural de la microbiota, produciendo una disbiosis (Hojo K. y cols., 2009; Takahashi N. y Nyvad B., 2008). Cuando el pH del medio es menor al pH crítico de desmineralización del esmalte, que corresponde a 5,5, se produce un desequilibrio entre los procesos fisiológicos normales de desmineralización y

remineralización del esmalte y la dentina, desencadenando así la formación de la lesión de caries (Figura 1) (Dong Y. y cols., 1999).



Figura 1. Esquema de la fisiología de equilibrio entre desmineralización y remineralización en la superficie dentaria. Una vez que se rompe este equilibrio en favor de la desmineralización se desencadena la formación de la lesión de caries. (Obtenida y adaptada de Fejerskov O. y cols. 2008).

Inicialmente, se identificó a *Streptococcus mutans* como el principal agente etiológico de las lesiones de caries, por sus características acidogénicas y acidúricas (Tanzer J. y cols., 2001). Sin embargo, la enfermedad de caries no tiene una etiología microbiana específica, ya que cualquier especie con características acidogénicas y/o acidúricas puede contribuir con esta patología, como, por ejemplo, miembros del ex género *Lactobacillus spp**, *Bifidobacterium spp.* y *Streptococcus sobrinus* (Takahashi N., Nyvad B., 2011; Marsh P., 2003). Estos microorganismos se definen actualmente como patobiontes, es decir, son habitantes endógenos normales de la cavidad oral, que, en condiciones de un ecosistema alterado, tienen la capacidad de generar determinadas patologías (Sebastián-Domingo J. y Sánchez-Sánchez C., 2018).

* Debido a los avances en secuenciación de genomas el género *Lactobacillus spp.* ha sido recientemente reestructurado dando origen a 25 géneros diferentes, entre los que se encuentran *Lactocaseibacillus*, *Limosilactobacillus* y *Lactiplantibacillus* (Zheng J. y cols, 2020).

Hipótesis Extendida de Placa Ecológica

Actualmente, se ha replanteado el proceso de caries desde una perspectiva microbiológica, bioquímica, ecológica y clínica. Takahashi N. y Nyvad B. (2008), plantearon la hipótesis extendida de 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 consta de tres etapas (Takahashi N. y Nyvad B., 2011):

1. 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 bacterianas del género *Streptococcus* del tipo no *mutans* y del género *Actinomyces*.
2. Etapa acidogénica: episodios moderados y frecuentes de acidificación del medio. Las propiedades acidogénicas y acidúricas de las bacterias se incrementan, produciendo una adaptación y selección microbiana. Cuando el equilibrio se altera por un tiempo prolongado, puede provocar el inicio o progresión de la lesión de caries dental. Predominan especies bacterianas del género *Streptococcus* del tipo no *mutans* y del género *Actinomyces* de bajo pH.
3. 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 desplazadas, y reemplazadas por especies bacterianas más acidúricas como *S. mutans*, miembros del ex género *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., instalándose una disbiosis. Por lo tanto, existirá una gran pérdida neta de minerales y una rápida progresión de la lesión.

Streptococcus mutans y Caries Dental

El género *Streptococcus*, perteneciente a la familia *Streptococcaceae*, es un grupo de bacterias formado por cocos Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativa, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7,0 a pH 4,2 en aproximadamente 24 horas (Abranches J. y cols., 2018). Desde el punto de vista metabólico se caracteriza por fermentar glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. *S. mutans* se visualiza como bacilo cuando se aísla de un medio con pH ácido y como cocácea cuando se sub-cultiva en un medio neutro o alcalino, de ahí deriva su nombre. *S. mutans*. Se ha subclasificado en varios tipos en base a las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *S. mutans* son c, e, f y k (Ojeda J. y cols., 2013).

S. mutans es un habitante de la microbiota oral que ha sido consistentemente asociado a caries dental (Lemos J. y cols., 2019) y de infecciones graves por *Streptococcus* del grupo viridans, tales como bacteriemia y endocarditis (Spellerberg B. y Brandt C., 2015). En cavidad oral, las comunidades bacterianas de *S. mutans* se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Estos se han caracterizado como colonizadores de la biopelícula asociada a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación con la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de los carbohidratos (Ojeda J. y cols., 2013).

Las cepas de *S. mutans* producen enzimas llamadas glucosiltransferasas, que utilizan la glucosa de la sacarosa como sustrato para sintetizar exopolisacáridos llamados glucanos. Dentro de los glucanos que produce se encuentran los insolubles en agua, los cuales son los principales componentes que sirven como andamiaje para la formación de biopelículas y promueven la acumulación local de células microbianas mientras se forma la matriz polimérica que protegerá a las bacterias inmersas (Lemos J. y cols., 2019).

Interacciones Bacterianas en la Biopelícula Dental

Los microorganismos se encuentran asociados en biopelículas, las cuales corresponden a comunidades bacterianas organizadas en una matriz de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Flemming H. y Wingender J., 2010). Se ha descrito que la integridad de la comunidad en la biopelícula se mantiene mediante adhesión intermicrobiana, señalización celular (por contacto célula a célula), comunicación metabólica y *quorum sensing* (Wright C. y cols., 2013).

El proceso de formación de biopelículas se inicia a través de la unión de baja afinidad de las células planctónicas a un sustrato, seguido de una adhesión de alta afinidad mediada por receptores específicos. Las microcolonias se desarrollan tras el crecimiento y la división de las células unidas, a veces denominada película de enlace. Posteriormente, el reclutamiento de células planctónicas (de la fase fluida) conduce a un mayor desarrollo de la comunidad. Además, el reclutamiento de especies bacterianas heterotípicas, y la adhesión inicial de múltiples especies en las proximidades, conduce a la formación de comunidades multiespecies (polimicrobianas). La integridad de la comunidad de biopelículas se mantiene mediante la adhesión intermicrobiana, la señalización celular mediante el contacto entre células, la comunicación metabólica y la detección de quórum (Swift S. y cols., 2001; Blango M. y Mulvey M., 2009).

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 (Wright C. y cols., 2013). Esta simbiosis contribuye al fenómeno ampliamente descrito de resistencia a los agentes antimicrobianos (Singh S. y cols., 2021). Las biopelículas también son más resistentes a la eliminación mecánica y a la muerte por el sistema inmunitario del hospedero (Leid J. y cols., 2005).

En la biopelícula, se produce una red de intercambios metabólicos entre los microorganismos que la componen, que pueden ser cooperativos o competitivos (Jenkinson H., 2011). En la interacción cooperativa, ciertas especies que crecen en la comunidad liberan metabolitos que pueden ser captados y utilizados como

nutrientes por otros habitantes. Esta sinergia metabólica dentro de la comunidad microbiana puede permitir el desarrollo de una microbiota más compleja (Wright C. y cols., 2013).

La formación de la comunidad microbiana se inicia cuando algunas interaccionan directamente con la película salival en las superficies dentales disponibles. Los organismos pioneros o colonizadores tempranos incluyen muchas especies de *Streptococcus* orales (Abranches J. y cols., 2018), *Actinomyces* spp., *Gemella* spp. y *Rothia* spp. (Jenkinson H., 2011). Estos primeros colonizadores son todos componentes de la microbiota normal (Aas J. y cols., 2005), y se sabe que en general no son directamente responsables del desarrollo de un estado de enfermedad. Sin embargo, los primeros colonizadores como las bacterias del género *Streptococcus* (Palmer R. y cols., 2001) pueden alterar el potencial patogénico de la biopelícula oral, a través de su influencia en el desarrollo de la comunidad de esta biopelícula y elevando el potencial patogénico de otras bacterias (Whitmore S. y Lamont R., 2011).

Quorum Sensing: Streptococcus mutans

El *quorum sensing* es un proceso de comunicación bacteriana entre cepas, especies y géneros, que controla de manera sincronizada la expresión génica frente a cambios en la densidad celular y complejidad de las especies de una población, coordinando el comportamiento bacteriano (Wai-Leung N. y Bassler B., 2009).

Existen moléculas de *Quorum Sensing* 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 (Wai-Leung N. y Bassler B., 2009).

Las bacterias Gram positivo se comunican por dos sistemas de señalización distintos:

1. Vía de señalización LuxS

El primer sistema implica una familia de moléculas de señalización producidas por la enzima LuxS, denominadas autoinductor-2 (AI-2). La enzima LuxS actúa sobre el sustrato S-ribosil-homocisteína generando por una parte homocisteína, reacción que es parte del ciclo de metilo activado central de la célula, y como subproducto genera 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), el cual se convierte espontáneamente en AI-2 (Figura 2) (Sun J. y cols., 2004; Vendeville A. y cols. 2005). Originalmente, AI-2 fue descrito en el microorganismo marino *Vibrio harveyi* (Bassler B. y cols., 1993); sin embargo, se han descrito que más de 55 especies bacterianas Gram positivo y negativo producen AI-2 (Hardie K. y Heurlier K., 2008; Zhao J. y cols., 2018). En la cavidad oral muchas especies de diversos géneros producen AI-2, incluyendo a *S. mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium dentium* (Chung W. y cols., 2001; Merritt J. y cols., 2005; Rickard A. y cols., 2006; Villarroel R., 2018; García P., 2018).

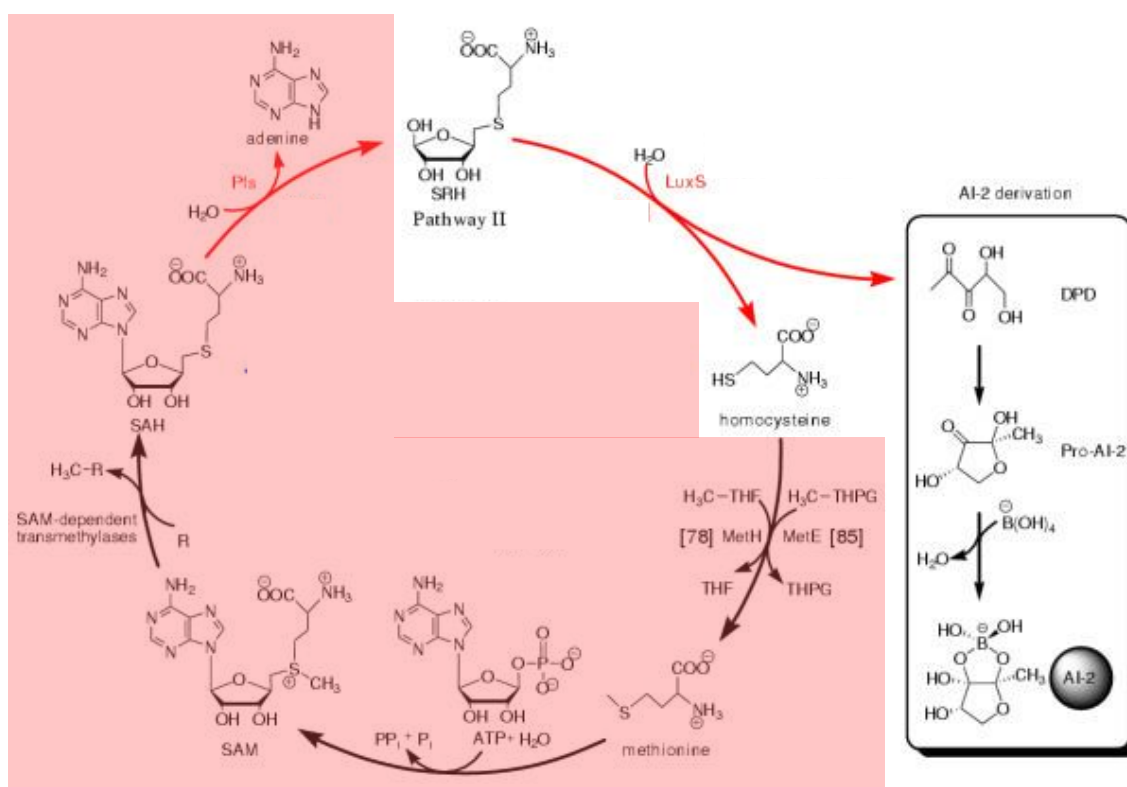


Figura 2. Ciclo de metilo activado y síntesis de AI-2 mediado por LuxS. SRH: S-ribosil-homocisteína; DPD: 4,5-dihidroxi-2,3-pentanonodiona; Pro-AI-2: precursor de AI-2. (Obtenida y Adaptada desde Sun J. y cols. 2004).

Se ha reportado que las bacterias orales comensales normalmente secretan bajos niveles de AI-2 en el medio, ambiente en el cual se encuentran normalmente (Kolenbrander P. y cols., 2006). Éstas son inhibidas por el aumento de concentración de AI-2, en consecuencia, los altos niveles de AI-2 aumentan la acumulación de bacterias patobiontes y reducen el crecimiento de bacterias comensales, lo que se entiende como competencia. Teniendo en cuenta las diferentes concentraciones de AI-2, algunos investigadores proponen a AI-2 como un modulador para comunidades microbianas multiespecies en transición de una comunidad beneficiosa a una comunidad patógena (Kolenbrander P. y cols., 2010).

En *S. mutans* el sistema de LuxS tiene un papel importante en la regulación de ciertos procesos cruciales para la patogénesis. Al respecto, Wen y cols, 2004, describieron que la delección del gen *luxS* resultó en una disminución en más del 50% de la expresión de la fructanasa, una enzima determinante de patogenicidad. La cepa deficiente en LuxS mostró una menor producción del ácido, pero aún podía sufrir adaptación al medio ácido (Wen Z. y Burne R., 2004).

Merritt J. y cols. también informaron que las cepas de *S. mutans* deficientes en LuxS forman biopelículas granulares en cubreobjetos de vidrio, mientras que las biopelículas de tipo silvestre parecen lisas y confluentes, como lo revela la microscopía de contraste de fase (Merritt J. y cols., 2005).

Por otra parte, se ha descrito que el uso de moléculas capaces de interferir con la detección o señalización de AI-2, también ejercen un efecto inhibitor de la formación de biopelículas de *S. mutans*, en al menos un 40-50% con respecto al control, sin afectar significativamente el crecimiento bacteriano (Muras A. y cols., 2018).

2. Vía de señalización ComABCDE

El segundo sistema de señalización mediada por *quorum sensing* consiste en oligopéptidos codificados genéticamente como autoinductores (Waters C. y Bassler B., 2005). Esta comunicación ha sido descrita en *S. mutans* y *S. gordonii* para intercambio genético y potenciar la patogenicidad (Wright C. y cols., 2013).

Uno de los roles de esta vía es favorecer la capacidad de *S. mutans* de producir mutacinas, que son antibióticos peptídicos encargados de la defensa de esta bacteria frente a otros microorganismos orales. La molécula de señalización que da inicio a esta cascada de transducción se denomina péptido estimulante de la competencia (CSP) o péptido inductor de mutacina (MIP), que se encuentra codificado por el gen *comC*. El CSP se sintetiza inicialmente como un propéptido, llamado ComC, el cual es procesado a un péptido de 21 residuos (denominado 21-CSP) y secretado al medio extracelular por un transportador de tipo ABC llamado ComA. En este lugar, es procesado nuevamente por una enzima presente en la membrana llamada SepM, obteniendo el péptido 18-CSP, el que es reconocido por ComD, un receptor de tipo histidina-kinasa. Esto desencadena la fosforilación y consecuente activación de ComE, el cual es el encargado de regular la producción de mutacinas en *S. mutans* y al mismo tiempo activa la transcripción de *comC* y *comDE* (Figura 3) (Hossain M. y Biswas I. 2012; Lemos J. y cols., 2019).

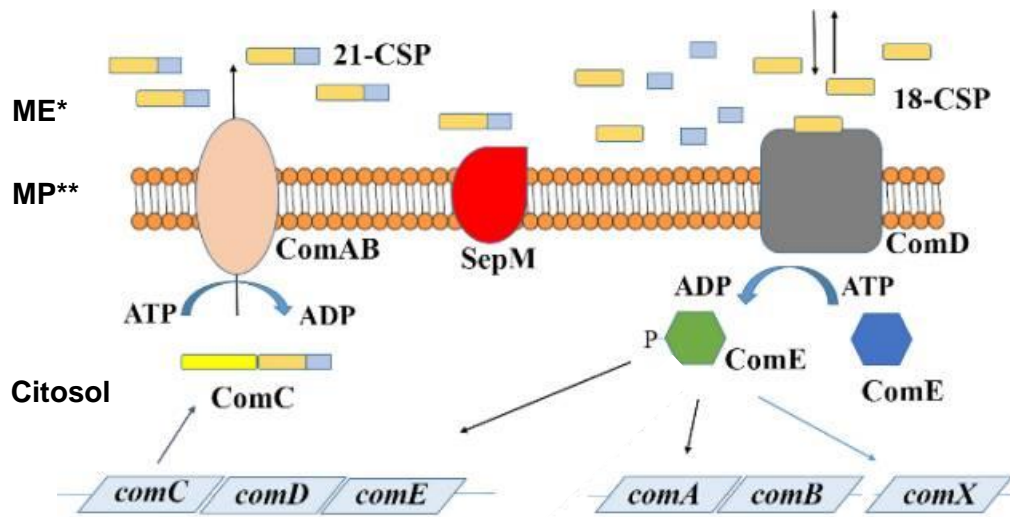


Figura 3. Vía de señalización ComABCDE en *S. mutans*. Secuencia de formación y transformación de CSP y cascada de transducción consecuente (Obtenida de Hossain M. y Biswas I., 2012). *Medio extracelular; **Membrana plasmática.

Además, se ha descrito que el sistema *quorum sensing* de *S. mutans* mediado por CSP también afecta su acidogenicidad y aciduricidad y que estas propiedades se expresan de manera óptima en células organizadas dentro de una biopelícula, en oposición a cuando estas se encuentran aisladas (Senadheera D. y cols., 2008). Estos mecanismos de patogenicidad son dependientes de la transformación genética de *S. mutans* el cual requiere el desarrollo de competencia, que consiste en un estado fisiológico transitorio que permite la captación de ADN del medio. Es la misma vía de detección de *quorum* mediada por CPS en el cual la fosforilación de ComE regula la expresión de *comX* (Figura 3), un gen que codifica un factor requerido específicamente para la síntesis de proteínas de competencia que están involucradas en la absorción e internalización del ADN (Ahn S. y cols., 2006).

En *S. gordonii*, se determinó que una mutante de inactivación del gen *comD* formaba biopelículas que carecían de la estructura tridimensional de la cepa silvestre, relacionando así el proceso de *quorum sensing* con la formación de biopelículas (Senadheera D. y cols., 2008).

Inhibición del *quorum sensing* como estrategia antibacteriana

La caries dental constituye la enfermedad oral de mayor incidencia y prevalencia en el mundo (Pine C. y cols., 2004). El estudio de la enfermedad de caries se ha basado en crear nuevas técnicas terapéuticas que permitan eliminar o al menos disminuir su morbilidad. Se establece que la prevención es una herramienta mucho menos costosa y más eficaz cuando hablamos de caries dental (Rojas I., 2012).

La caries dental es producida por una disbiosis a consecuencia de la metabolización de azúcares por parte de ciertas bacterias presentes en la cavidad oral (Hojo K. y cols., 2009; Takahashi N. y Nyvad B., 2008). Por este motivo parece relevante poder controlar, con la finalidad de mantener un equilibrio ecológico, la microbiota bucal.

Durante los últimos años, se han estudiado ampliamente diferentes estrategias para interferir con el proceso de *quorum sensing*, examinando su potencial en el control bacteriano. Estos estudios han demostrado que estas estrategias son prometedoras para disminuir la patogenicidad bacteriana, aumentando la susceptibilidad a agentes antimicrobianos y evitando la formación de biopelículas (Rémy B. y cols., 2018).

Dado que ambos sistemas de *quorum sensing* regulan la patogenicidad en *S. mutans* (adhesión, acidogénesis, aciduria, competencia genética, etc.), parece relevante, entonces, poder estudiar inhibidores de *quorum sensing* en este microorganismo, definir sus mecanismos de acción y determinar su potencial uso intraoral. para así trazar nuevas estrategias terapéuticas y/o preventivas para el control de la caries dental.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se han descrito moléculas, con posible uso intraoral, que interfieran con el sistema de *quorum sensing* de *Streptococcus mutans* y que afecten su capacidad patogénica?

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar, mediante una revisión de la literatura, potenciales moléculas de uso intraoral que interfieran en los mecanismos de *quorum sensing* en *Streptococcus mutans*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar inhibidores y mecanismos de acción para interferir en el sistema ComABCDE de *quorum sensing* de *Streptococcus mutans*.
- 2.- Identificar inhibidores y mecanismos de acción para interferir en el sistema LuxS de *quorum sensing* de *Streptococcus mutans*.
- 3.- Determinar el potencial uso intraoral preventivo y/o terapéutico de los inhibidores caracterizados anteriormente.

6. METODOLOGÍA

Este trabajo corresponde a una revisión sistemática cualitativa realizada en enero del 2021. Para su elaboración se utilizaron los motores de búsqueda de Pubmed, Web Of Science (WOS), Scopus y Scielo. Se utilizó el método de búsqueda con texto libre y las combinaciones de términos que se utilizaron fueron: "INHIBITION", "QUORUM SENSING", "*STREPTOCOCCUS MUTANS*" y el operador booleano "AND"; "QUORUM QUENCHING", "*STREPTOCOCCUS MUTANS*" y el operador booleano "AND"; finalmente los términos "INHIBICIÓN", "QUORUM SENSING", "*STREPTOCOCCUS MUTANS*" y el operador booleano "Y". Además, se aplicó el método de revisión manual de referencias.

Criterios de Inclusión: Se consideraron los siguientes tipos de artículos: revistas científicas, tesis, libros y documentos científicos. Se seleccionaron para el análisis artículos completos, en español o inglés. Se incluyeron ensayos *in vitro*, estudios clínicos, ensayos *in vivo*. No se restringió por el año de publicación.

Criterios de Exclusión: Se excluyeron revisiones, resúmenes de congreso, reportes de caso, metaanálisis y artículos de opinión.

Una vez obtenidos los artículos se analizaron los resúmenes de estos para determinar si eran atingentes al tema de interés, se tabularon los documentos obtenidos por título, autores, año de publicación y motor de búsqueda donde fueron encontrados. Finalmente se analizaron los documentos completos y se descartaron los que no se relacionan con las vías LuxS y/o ComABCDE y los que no trabajan en *S. mutans*.

Se registraron los mecanismos de patogenicidad alterados por los inhibidores en las distintas vías de señalización y si éstos regulaban los genes involucrados en estas vías. Además, se registró la concentración mínima inhibitoria (CMI) o concentración inhibitoria media máxima (CI₅₀) para así poder evidenciar que la alteración en el factor de riesgo estudiado este asociado a la inhibición de *quorum sensing* y no a acción bacteriostática del inhibidor.

Para determinar el potencial uso intraoral de los componentes estudiados se utilizaron los criterios de citotoxicidad en células eucariontes, por lo que se incluyeron referencias manuales en caso de que dicha información no se encontrase en el estudio analizado. También se registró el tiempo de exposición

al cual fueron sometidos los cultivos de *S. mutans* para poder analizar su posible aplicación clínica.

Todos estos datos se tabularon según las variables mencionadas.

7. RESULTADOS

Resultados de búsqueda bibliográfica.

En una primera etapa utilizando la metodología de texto libre con los términos: “INHIBITION”, “QUORUM SENSING”, “*STREPTOCOCCUS MUTANS*” y el operador booleano “AND” se encontraron un total de 123 artículos en los motores de búsqueda Pubmed, Web Of Science (WOS) y Scopus. Luego se aplicaron los criterios generales de inclusión y exclusión logrando obtener 103 artículos. Con los términos “QUORUM QUENCHING”, “*STREPTOCOCCUS MUTANS*” y el operador booleano “AND” en los motores de búsqueda Pubmed, Web Of Science (WOS) y Scopus y se identificaron 157 artículos, luego de aplicar los criterios generales de inclusión y exclusión se obtuvieron 135 documentos. Con los términos “INHIBICIÓN”, “QUORUM SENSING”, “*STREPTOCOCCUS MUTANS*” y el operador booleano “Y” en el motor de búsqueda Scielo no se obtuvieron resultados. Se leyeron títulos y resúmenes de estos artículos para determinar la relación con el tema estudiado y se obtuvieron 87 documentos. Se eliminaron los artículos que se encontraban duplicados en los distintos motores de búsqueda y se recuperaron 34 artículos científicos. Finalmente se analizaron estos documentos y se excluyeron 17 por no incluir experimentos que inhiban el sistema *quorum sensing* de *S. mutans*. Además, se incluye 1 artículo en esta etapa por la metodología de búsqueda manual de referencias consolidando finalmente un total de 18 artículos científicos (Figura 4 y Tabla 1). Los artículos incluidos fueron publicados entre el año 2011 y el año 2020.

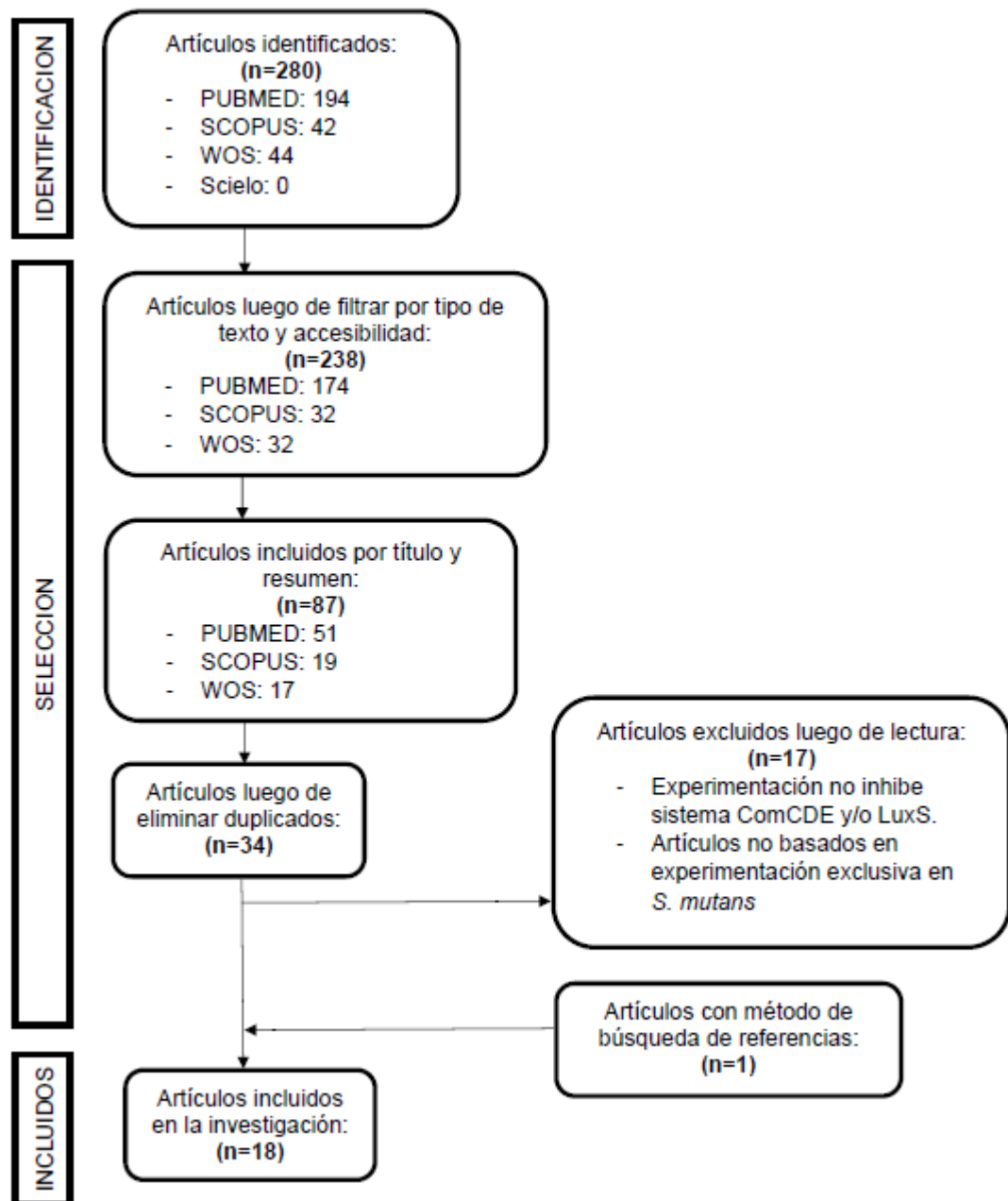


Figura 4. Diagrama de flujo de búsqueda bibliográfica para la selección de artículos científicos.

Tabla 1. Artículos seleccionados para investigación, autores, año de publicación y motores de búsqueda donde se encontraron.

Nombre del artículo	Autores	Año de publicación	Motor de búsqueda			
			WOS	SCOPUS	PUBMED	BMR*
Development of an Antivirulence Drug against <i>Streptococcus mutans</i> : Repression of Biofilm Formation, Acid Tolerance, and Competence by a Histidine Kinase Inhibitor, Walkmycin C	Eguchi Y. y cols.	2011			X	
Efficacy of <i>E. officinalis</i> on the Cariogenic Properties of <i>Streptococcus mutans</i> : A Novel and Alternative Approach to Suppress <i>Quorum-Sensing</i> Mechanism	Hasan S. y cols.	2012	X		X	
Use of the <i>quorum sensing</i> inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i> and its <i>luxS</i> mutant strain	He Z. y cols.	2012			X	
Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in <i>Streptococcus mutans</i> : An approach to inhibit	Adil M. y cols.	2014			X	
S-aryl-L-cysteine sulphoxides and related organosulphur compounds alter oral biofilm development and AI-2-based cell-cell communication	Kasper S. H. y cols.	2014			X	
Combinatorial effects of aromatic 1,3-disubstituted ureas and fluoride on <i>in vitro</i> inhibition of <i>Streptococcus mutans</i> biofilm formation	Kaur G. y cols.	2016	X	X	X	
High-throughput Screening of Small Molecule Inhibitors of the <i>Streptococcus Quorum-sensing</i> Signal	Ishii S. y cols.	2017	X	X	X	
Inhibiting effects of fructanase on competence-stimulating peptide-dependent <i>quorum sensing</i> system in <i>Streptococcus mutans</i>	Suzuki Y. y cols	2017	X	X	X	
Inhibition of the <i>quorum sensing</i> system (ComDE Pathway) by aromatic 1,3-di-m-tolylurea (DMTU): cariostatic effect with fluoride in wistar rats	Kaur G. y cols.	2017	X	X	X	
Norspermidine changes the basic structure of <i>S. mutans</i> biofilm	Ou M. y cols.	2017			X	
Efflux inhibitor suppresses <i>Streptococcus mutans</i> virulence properties	Zeng H. y cols.	2017			X	
Inhibition of <i>Streptococcus mutans</i> biofilm formation by extracts of <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J, a bacterium with wide-spectrum <i>quorum quenching</i> activity	Muras A. y cols.	2018	X	X	X	
Effects of 7S globulin 3 derived from the adzuki bean [<i>Vigna angularis</i>] on the CSP- and eDNA- dependent biofilm formation of <i>Streptococcus mutans</i>	Senpuku H. y cols.	2019	X	X	X	
Assessing the impact of curcumin on dual-species biofilms formed by <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Candida albicans</i>	Li X. y cols.	2019			X	
Combinatorial effects of trans-cinnamaldehyde with fluoride and chlorhexidine on <i>Streptococcus mutans</i>	Balasubramania A. R. y cols.	2020			X	
<i>Rhodiola rosea</i> extract inhibits the biofilm formation and the expression of virulence genes of cariogenic oral pathogen <i>Streptococcus mutans</i>	Zhang Z. y cols.	2020			X	
Anti-Biofilm Effect of Egg Yolk Phosvitin by Inhibition of Biomass Production and Adherence Activity against <i>Streptococcus mutans</i>	Hyeon-Joong K. y cols.	2020			X	
Activity of <i>Ligustrum robustum</i> (Roxb) Blume extract against the biofilm formation and exopolysaccharide synthesis of <i>Streptococcus mutans</i>	Zhang Z. y cols.	2021			X	

*BMR: Búsqueda manual de referencias

Inhibidores del sistema ComABCDE.

Dentro de los artículos analizados, fue posible identificar 16 inhibidores que interfieren de manera negativa en la vía de señalización ComABCDE en *S. mutans*, dentro de los cuales 12 de ellos regulan negativamente la expresión de los genes involucrados en esta vía (Tabla 2). La procedencia de algunos de estos inhibidores es de origen natural: extracto de *Embllica officinalis*, 7S globulina 3 aislada del frijol de Adzuki, Cúrcuma, Trans-cinamaldehído derivado de la canela, extracto de *Rhodiola rosea*, extracto de *Ligustrum robustum*, Fosvitina extraída del huevo, Furanona C-30 obtenida del alga roja *Delisea pulchra* y Eugenol derivado del clavo de olor; otras de origen bacteriano: Fructanasa (*Streptococcus salivarius*) y Walkmicina C (*Streptomyces* sp. cepa MK632-100F11); otros de origen químico: Norespermidina una poliamida, Reserpina un alcaloide y el Compuesto 1; finalmente el DMTU fue desarrollado de manera *in silico* y luego evaluado *in vitro*.

Los mecanismos de acción descritos son: inactivación de CSP que es el péptido que da inicio a la cascada de transducción. Inhibición del transportador ComAB, específicamente en el estudio de Ishii S. y cols. (2017) trabajan con una molécula que se une a su dominio peptidasa N-terminal (PEP) induciendo una modificación estructural en el sitio de unión de éste. Otro mecanismo de acción descrito es la inhibición de las bombas de eflujo de *S. mutans* e inhibición de receptores histidina quinasa donde el inhibidor estudiado por Eguchi Y. y cols. 2011 no inhibe específicamente el receptor ComDE, pero de igual manera interfiere en la vía de transducción. Además, es posible ver que la mayoría de los inhibidores regulan de manera negativa la expresión del operón *comDE*.

En 6 de los inhibidores estudiados se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) durante el estudio y en 1 inhibidor solo se determinó la concentración inhibitoria media máxima (CI₅₀) (Tabla 2).

Finalmente se ve que el mecanismo de patogenicidad prevalentemente más afectado es la formación de biopelículas, seguido de la inhibición de la adhesión y la competencia genética (Tabla 2).

Tabla 2. Inhibidores de la vía de señalización ComABCDE en *S. mutans*.

Inhibidor	Objetivo molecular	Cepas utilizadas	Mecanismo de patogenicidad afectado	Gen regulado negativamente	Concentración	CMI*	Autores
Walkmicina C	Receptor de histidina quinasa (ComDE)	<i>S. mutans</i> UA159/	Inhibición en la formación de biopelículas		1,25 µg/ml		Eguchi Y. y cols. 2011
		UA159 <i>vicK</i> /	Inhibición de tolerancia a ácidos	<i>comCDE</i>	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml – 2,5 µg/ml	
		UA159 <i>ciaH</i> /		UA159 <i>liaS</i> /			
		UA159 <i>comD</i>	Inhibición de la competencia		2,5 µg/ml		
Fracción cruda de <i>Emblica officinalis</i> / Fracción etanólica de <i>Emblica officinalis</i>	Indefinido	<i>S. mutans</i> MTCC497	Inhibición en la formación de biopelículas		2,44 – 156,16 µg/ml		Hasan S. y cols. 2012
			Inhibición de la adhesión	<i>comDE</i>	39 - 612 µg/ml	625 µg/ml / 1250 µg/ml	
			Inhibición de la producción de ácidos		312,5 µg/ml		
Furanona C-30	Indefinido	<i>S. mutans</i> UA159/ UA159 <i>luxS</i>	Inhibición en la formación de biopelículas	<i>comDE</i>	2,0 y 4,0 g/ml	n/d***	He Z. y cols. 2012
Eugenol	Indefinido	<i>S. mutans</i> MTCC497	Inhibición en la formación de biopelículas	<i>comDE</i>	0,312 µg/ml	0,625 µg/ml	Adil M. y cols. 2014
DMTU**	ComA	<i>S. mutans</i> MTCC497/ <i>S. mutans</i> SM4 multirresistente	Inhibición en la formación de biopelículas	n/d***	0,23 – 3,75 µM	1,89 µM	Kaur G. y cols. 2016
Compuesto 1	ComA	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas	n/d***	25 µM	38 µM (IC50****)	Ishii S. y cols. 2017
			Inhibición de la competencia		10 µM		
Fructanasa	CSP****	<i>S. mutans</i> UA159/ GS5/ mutantes <i>gtfBC</i> y <i>comCD</i> y GS5	Inhibición en la formación de biopelículas		57 U/ml	n/d***	Suzuki Y. y cols. 2017
			Inhibición de la competencia		285 U/ml		
DMTU**	ComA	<i>S. mutans</i> MTCC497/ <i>S. mutans</i> SM4 multirresistente	Inhibición de la adhesión	<i>comABDE</i>	3,75 µM	1,89 µM	Kaur G. y cols. 2017
Norespermidina	Indefinido	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas	<i>comCDE</i>	5 mM	n/d***	Ou M. y cols. 2017
Reserpina	Bombas de eflujo	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas		32 µg/ml		Zeng H. y cols. 2017
			Inhibición de tolerancia a ácidos	<i>comACDE</i>	32 µg/ml	>128 µg/ml	
			Inhibición de la competencia		32 µg/ml		

			Inhibición en la formación de EPS		32 µg/ml		
7S globulin 3	CSP**	<i>S. mutans</i> UA159/ UA159sunL	Inhibición en la formación de biopelículas	n/d***	0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml y 1,0 mg/ml	n/d***	Senpuku H. y cols. 2019
			Inhibición de la competencia		0,34 µg/ml		
Cúrcuma	Indefinido	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas	comCDE	0,5 mM	n/d***	Li X. y cols. 2019
			Inhibición en la formación de EPS				
Trans-cinamaldehído	Indefinido	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas	comABDE	500 µg/ml	n/d***	Balasubramania A. y cols. 2020
			Inhibición de la producción de ácidos		500 µg/ml		
<i>Rhodiola rosea</i>	Indefinido	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas	comDE	0,50 µg/µL y 0,25 µg/µL	n/d***	Zhang Z. y cols. 2020
			Inhibición en la formación de EPS				
<i>Ligustrum robustum</i>	Indefinido	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas	comDE	0,10% (m/v) y 0,05% (m/v)	n/d***	Zhang Z. y cols. 2021
			Inhibición en la formación de EPS		0,20% (m/v) y 0,10% (m/v)		
Fosvitina	Indefinido	<i>S. mutans</i> KCTC 5124, 5458 y 5316	Inhibición en la formación de biopelículas	comDE	0,25, 0,5 y 1 mg/ml	n/d***	Hyeon-Joong K. y cols. 2020
			Inhibición de la adhesión		0,25, 0,5 y 1 mg/ml		
			Inhibición en la formación de EPS		0,25, 0,5 y 1 mg/ml		

*CMI: Concentración mínima inhibitoria. **DMTU: 1,3-di-m-tolylurea. ***n/d: no determinado. ****CSP: péptido estimulante de la competencia. *****IC50: concentración inhibidora media máxima.

Inhibidores del sistema LuxS en *S. mutans*

Se identificaron 4 inhibidores que interfieren en la vía de señalización LuxS, de los cuales 3 regulan negativamente la expresión del gen *luxS* (Tabla 3). La procedencia de alguno de estos inhibidores es de origen natural (Trans-cinamaldehído derivado de la canela), otro de origen bacteriano (sobrenadante de cultivo de *Tenacibaculum* sp. 20J) y otros de origen químico (Norespermidina, una poliamida, y Sulfóxido de cisteína, un compuesto organosulfurado).

Un mecanismo de acción descrito es la disminución de producción de autoinductor-2 (AI-2) donde el estudio de Kasper S. y cols. (2014) sugiere la posibilidad de que esta intervención sea a nivel del ciclo metilo activado que es donde se produce esta molécula.

Solo en 1 de los inhibidores estudiados se determinó se determinó la concentración inhibitoria media máxima (CI₅₀) (Tabla 3).

Finalmente, la alteración en la formación de biopelículas es el efecto principal que desencadenan estos inhibidores.

Tabla 3. Inhibidores de la vía de señalización LuxS en *S. mutans*.

Inhibidor	Objetivo molecular	Cepas utilizada	Mecanismo de patogenicidad afectado	Gen regulado negativamente	Concentración	CMI*	Autores
Sobrenadante de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J	Anti AI-2	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	Inhibición en la formación de biopelículas	<i>luxS</i>	100 µg/ml	n/d**	Muras A. y cols. 2018
Trans-cinamaldehído	Indefinido	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas Inhibición de la producción de ácidos	<i>luxS</i>	500 µg/ml	n/d**	Balasubramania A. y cols. 2020
Norespermidina	Indefinido	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas	<i>luxS</i>	5 mM	n/d**	Ou M. y cols. 2017
Compuesto 7 (Sulfóxido de cisteína)	Producción de AI-2	<i>S. mutans</i> UA159	Inhibición en la formación de biopelículas	<i>luxS</i>	1 mM	0,96 mM (IC50***)	Kasper S. y cols. 2014

*CMI: Concentración mínima inhibitoria. **n/d: No determinado. ***IC50: concentración inhibitoria media máxima.

Uso intraoral de inhibidores estudiados

Los tiempos de exposición varían de 10 min a 58 horas dependiendo del mecanismo de patogenicidad que se busque alterar. El estudio de Kaur G. y cols. 2017 es el único que analizó varias exposiciones sostenidas en el tiempo, pero no indica la duración de dichas exposiciones. De los 18 inhibidores estudiados 9 son considerados seguros ya que no presentan citotoxicidad sobre células eucariontes y 2 son considerados citotóxicos en células eucariontes según la literatura.

Tabla 4. Tiempo de exposición según mecanismo de patogenicidad afectado, y citotoxicidad en células eucariontes de los componentes estudiados.

Componente	Mecanismo de patogenicidad afectado	Tiempo de exposición	Citotoxicidad
Walkmicina C	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	n/d*
	Inhibición de tolerancia a ácidos	1 h	
	Inhibición de la competencia	10 min	
Fracción cruda de <i>Emblica officinalis</i>	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	No ¹
	Inhibición de la adhesión	24 h	
	Inhibición de la producción de ácidos	24 h	
Fracción etanolica de <i>Emblica officinalis</i>	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	No ¹
	Inhibición de la adhesión	24 h	
	Inhibición de la producción de ácidos	24 h	
Furanona C-30	Inhibición en la formación de biopelículas	4, 14 y 24 h	n/d*
Eugenol	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	Si ²
DMTU (1,3-di-m-tolylurea)	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	No ³
Compuesto 1	Inhibición en la formación de biopelículas	18 h	No ⁴
	Inhibición de la competencia	34 - 58 h	
Fructanasa	Inhibición en la formación de biopelículas	16 h	n/d*

	Inhibición de la competencia	48 h	
DMTU (1,3-di-m-tolylurea)	Inhibición de la adhesión	1 vez al día por 7 semanas	No ³
Norespermidina	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	Si ⁵
Reserpina	Inhibición en la formación de biopelículas	6, 12 y 24 h	
	Inhibición de tolerancia a ácidos	20, 35 y 50 min	n/d*
	Inhibición de la competencia	24 h	
7S globulin 3	Inhibición en la formación de biopelículas	16 h	n/d*
	Inhibición de la competencia	1 h	
Cúrcuma	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	No ⁶
	Inhibición en la formación de EPS		
Trans-cinamaldehído	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	No ⁷
	Inhibición de la producción de ácidos	8 h (c/ 30 min)	
<i>Rhodiola rosea</i>	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	No ⁸
	Inhibición en la formación de EPS		
<i>Ligustrum robustum</i>	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	No ⁹
	Inhibición en la formación de EPS		
Fosvitina	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	
	Inhibición de la adhesión	24 h	n/d*
	Inhibición en la formación de EPS	1 h	
Compuesto 7 (Sulfóxido de cisteína)	Inhibición en la formación de biopelículas	20 h	n/d*
Sobrenadante de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J	Inhibición en la formación de biopelículas	24 h	n/d*

* n/d: no determinado. ¹Middha S. y cols 2015; ²Mohammadi S. y cols 2017; ³Kaur G. y cols. 2017; ⁴Ishii S. y cols. 2017; ⁵Silva T.M. y cols. 2013; ⁶Soleimani V. y cols. 2018; ⁷National Toxicology Program 2004/ Hooth M.J. y cols. 2004; ⁸Zhang Z. y cols. 2020; ⁹Zhang Z. y cols. 2021.

8. DISCUSIÓN

Inhibición de *quorum sensing*.

Los principales mecanismos de patogenicidad de *S. mutans* como la adhesión, competencia, acidogenia y aciduria se encuentran regulados por el proceso de *quorum sensing*. El conocimiento de este mecanismo de comunicación abre la oportunidad a nuevas opciones de control de infecciones bacterianas mediadas por biopelículas a través de la inhibición de esta vía (Brackman G. y Coenye T., 2015). Todos los inhibidores descritos en esta revisión generan disminución en la expresión génica de la vía ComABCDE y/o LuxS en *S. mutans*, lo que se traduce en la inhibición de los mecanismos de patogenicidad mediados por *quorum sensing* antes mencionados.

Si bien en la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos de acción de estos inhibidores, se destacan como blancos terapéuticos los autoinductores que activan estas vías (CSP y AI-2). Como ya hemos analizado, a mayor concentración de autoinductor mayor es la proporción de bacterias patobiontes en la biopelículas (Kolenbrander P. y cols., 2010). Por este motivo parece relevante buscar inhibidores que interfieran en la producción de autoinductores, que inhiban los receptores de unión de estas moléculas o que quelen estos autoinductores, es decir, que el inhibidor se una al autoinductor presente en el medio quedando éste inactivo y sin posibilidad de unirse a su receptor.

Inhibición de la vía ComABCDE.

En el caso de la vía ComABCDE se encontraron inhibidores que quelan el péptido de competencia (CSP) de *S. mutans*, como la enzima fructanasa (Suzuki Y. y cols., 2017) o la proteína 7S globulina 3 (Senpuku H. y cols., 2019). Sin embargo, es importante recordar que la caries dental es una enfermedad mediada por biopelículas y lo descrito es que las secuencias de aminoácidos de los péptidos autoinductores son muy variables entre las especies bacterianas o, en algunos casos, incluso entre las cepas. Por lo tanto, el desarrollo de quelantes debería realizarse para cada especie, lo que implica baja eficiencia en la búsqueda de un único inhibidor que pueda quelar los autoinductores de todas

las especies patógenas presentes en la cavidad oral (Whatmore A. y cols., 1999; Ishii S. y cols., 2017).

También se reportaron 2 inhibidores (Compuesto 1 de Ishii S. y cols. 2017 y el DMTU de Kaur G. y cols. 2016 y 2017) que afectan la producción/liberación de este autoinductor mediante el bloqueo de la unión del propéptido ComC a su transportador ComAB y que de esta manera no se libere el péptido 21-CSP fuera de la membrana celular. El mecanismo de inhibición alostérica consiste en la unión del inhibidor en un lugar distinto al sitio de unión del transportador, lo que produce modificaciones estructurales en el sitio de unión impidiendo la unión del propéptido ComC al transportador ComAB. Éste se describe como un transportador de tipo ABC, que se compone de tres dominios: un dominio peptidasa N-terminal (PEP, peptidasa altamente específica y orientado hacia la cara extracelular de la membrana plasmática), un dominio transmembrana (canal para el propéptido), y un dominio de unión de nucleótidos-C-terminal (unión a ATP, orientado hacia la cara intracelular de la membrana plasmática) (Håvarstein L. y cols., 1995; Ishii S. y cols., 2006). Lo que se busca idealmente son inhibidores que sean afines con el sitio PEP ya que cataliza de manera inicial la cascada de señalización. Además, se encuentran específicamente solo en células procariontas, lo que disminuye la posibilidad de efectos adversos en humanos (Ishii S. y cols., 2017). Además, todas las PEP estreptocócicas tienen un mecanismo de reconocimiento de sustrato común lo que amplía el espectro de inhibición a otras bacterias orales dentro de esta categoría. Otra ventaja de utilizar este blanco farmacológico es que al encontrarse orientado hacia la cara externa de la membrana plasmática no se hace necesario buscar inhibidores que difundan a través de esta barrera.

Finalmente, el compuesto Walkmicina C (Eguchi Y. y cols., 2019), un inhibidor de receptores histidina-quinasa (HK) (Okada A. y cols., 2010) impide la unión del CSP a su receptor ComDE (no determina bajo que mecanismo) inhibiendo la cascada de transducción catalizada por esta vía. Sin embargo, este compuesto es inespecífico por lo que también inhibe otros receptores HK (VicK, CiaH y LiaS) de *S. mutans* involucrados, en conjunto con el receptor ComDE, en la expresión de mecanismos de patogenicidad dejando abierta la interrogante sobre la acción de este compuesto en dicho receptor. Debido a la baja especificidad de este inhibidor existe la posibilidad de que se afecten receptores HK de bacterias

comensales por lo que es relevante analizar los efectos adversos de la implementación de Walkmicina C (Okada A. y cols., 2010).

Si bien los mecanismos de acción de los demás inhibidores (*Embllica officinalis* de Hasan S. y cols., 2012; Furanona C-30 de He Z. y cols., 2012; Eugenol de Adil M. y cols., 2014; Norespermidina de Ou M. y cols., 2017; Reserpina de Zeng H. y cols., 2017; Cúrcuma de Li X. y cols., 2019; Trans-cinamaldehído de Balasubramania A. y cols., 2020; *Rhodiola rosea* de Zhang Z. y cols., 2020; *Ligustrum robustum* de Zhang Z. y cols., 2021; Fosvitina de Kim H. y cols., 2020), no se encuentra determinado, podemos evidenciar que tienen como factor común la disminución los niveles de ARNm de *comDE* lo que nos podría indicar una disminución en los niveles del receptor ComDE lo que generaría una interferencia de esta vía. Sin embargo, se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos que generan la regulación negativa de este gen.

Inhibición vía LuxS.

En el caso de la vía de señalización LuxS, se describe la inhibición en la producción de AI-2 en *S. mutans* con el uso de sulfóxido de cisteína (compuesto 7 derivado de la planta *P. alliacea*) (Kasper S. y cols., 2014). Los autores proponen que esta inhibición se debe a que presenta similitudes estructurales con varias moléculas pequeñas de organosulfuros que juegan un papel clave en el ciclo de metilo activado o debido a que bloquea la actividad enzimática que conduce a los precursores del autoinductor-2. En ese estudio además se incluye la experimentación con otras bacterias orales (*Streptococcus sanguinis* 10556 y *Actinomyces oris* MG1) con resultados similares a los de *S. mutans* por lo que su aplicación y efecto en bacterias colonizadoras primarias, y por ende en biopelículas orales, es de mayor espectro.

La inhibición del *quorum sensing* a través de la anulación de la producción de AI-2 mediada por LuxS, como en el caso de los inhibidores Norespermidina (Ou M. y cols., 2017) y Trans-cinamaldehído (Balasubramania A. y cols., 2020) a causa de la disminución de la expresión del gen *luxS*, o moléculas que participen en el ciclo metilo activado parece ser controversial. Esto es debido a que LuxS no solo incide en la producción intracelular de la molécula de señalización antes mencionada, sino que también participa en el ciclo metilo activado, el que

desempeña otras funciones celulares vitales de la bacteria como la síntesis de los aminoácidos metionina y homocisteína, y la mantención de la disponibilidad de grupos metilo para la metilación del ADN, ARN, ciertos metabolitos y proteínas. Debido a esto es que no se puede atribuir con certeza que la inhibición de los mecanismos de patogenicidad bacteriana sea causada directamente por el bloqueo en la señalización de *quorum sensing*. Por este motivo se hace relevante la complementación química, es decir, la adición de la molécula autoinductora pura sintética al medio de cultivo de un mutante *luxS*, para determinar que son funciones atribuibles a *quorum sensing* (Sztajer H. y cols., 2008).

Otro estudio relevante es el de Muras y cols, 2018, donde se describe una función anti-AI-2 con el sobrenadante del cultivo del microorganismo *Tenacibaculum* sp. 20J (Muras A. y cols., 2018). Sin embargo, en el estudio no se determinó si el mecanismo de acción consiste en la disminución de la producción de este autoinductor o quelación de la molécula, ya que en ensayos de bioluminiscencia con *V. harveyi* la señal disminuyó respecto a los controles. Esto nos indica que no se generó unión específica entre AI-2 y la bacteria, pero no si el motivo es debido a una menor cantidad de los niveles de este autoinductor o si éste se encuentra quelado.

En este estudio, proponemos que otro de los factores relevantes a analizar es la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se sugiere utilizar concentraciones sub CMI, ya que lo que se busca no es un efecto bactericida si no que la inhibición del sistema de *quorum sensing*, con el objetivo de disminuir los mecanismos de patogenicidad ya descritos. Un supuesto beneficio de los inhibidores de detección de quórum es que, debido a que no poseen acción bactericida sobre las células bacterianas, deberían ejercer una presión de selección más baja y, por lo tanto, ser menos susceptibles al desarrollo de resistencia a los medicamentos que los antimicrobianos (García-Contreras R y cols., 2016; Rémy B. y cols., 2018). En los inhibidores analizados se observa que para la supresión de la formación de biopelículas la walkmicina C, la *Embllica officinalis*, el eugenol, el DMTU, el compuesto 1 y la reserpina tienen efecto a concentraciones sub CMI, sin embargo, hay muchos inhibidores en los cuales no se describe si este valor ha sido determinado por lo que mayores estudios son necesarios.

Potencial uso intraoral de los inhibidores.

Respecto al potencial uso intraoral de estos inhibidores parece relevante analizar distintas aristas como el tiempo de exposición, dosis, citotoxicidad en células eucariontes, forma farmacéutica de los inhibidores e interacción con otras especies intraorales. El tiempo de exposición de los inhibidores estudiados va desde los 10 min a las 58 horas y en la mayoría de los casos solo se consideró una medición de tiempo, por lo que se hacen necesarios más estudios realizando curvas de tiempos de exposición que permitan registrar más mediciones de esta variable. El poder definir de manera adecuada el tiempo de exposición necesario para obtener el efecto descrito, nos brindaría un panorama más claro respecto a la forma farmacéutica (medio donde se unen los principios activos y excipientes para formular un medicamento y permitir su administración) (Aulton M., 2004) en que se podría utilizar el inhibidor de manera intraoral (barniz, colutorio, oro base, pasta dental). Para el caso de bacterias orales se sugiere utilizar de manera tópica intraoral para lograr un efecto localizado, pues estos inhibidores podrían afectar también a la microbiota presente en otros tejidos, ya que cuentan con vías de señalización de *quorum sensing* similares (Verbeke F. y cols., 2017).

Otro factor importante a considerar es que el inhibidor no afecte el desarrollo de la microbiota comensal y así mantener un equilibrio ecológico oral (Vijayakumar A. y cols., 2021). Esto debido a que el equilibrio de la biopelícula bucal es indispensable para el mantenimiento del estado de salud (Sarduy L. y González M., 2016). Por este motivo es necesario analizar los efectos de estos inhibidores en las bacterias orales caracterizadas como comensales.

Con el desarrollo de nuevas tecnologías en farmacología se han desarrollado nuevas formas de administración de fármacos como, por ejemplo, la vectorización de medicamentos. Este sistema de administración consiste en que el principio activo se une a un vector o transportador para poder así controlar el lugar y el tiempo donde se produce la liberación del fármaco. Algunos ejemplos de vectorización de medicamentos son las nano y micropartículas (Santos B. y Guerrero M., 1994). En el estudio de Minji Kang y cols. (2019) diseñan una micropartícula llamada PLGA (polilactida-co-glicólido) revestida con PBMP (poli metacrilato de butilo-co-metacrilatoiloxietilfosfato), esta micropartícula se une al

Ca²⁺ de la hidroxiapatita y mantiene concentraciones terapéuticas por periodos prolongados de tiempo de inhibidores de *quorum sensing*, en este caso la furanona C-30. la cual constituye una alternativa viable de administración del inhibidor. (Kang M. y cols., 2019).

El único inhibidor de los analizados en esta revisión que tiene estudios clínicos *in vivo* es el DMTU (Kaur G. y cols., 2017), con experimentación de citotoxicidad en órganos vitales y evaluación de formación de lesiones de caries en tejidos dentales con resultados prometedores. Además, es un compuesto que tiene un efecto antibacterial sinérgico con el flúor, elemento que es componente clave en las pastas dentales ya que potencia y favorece la remineralización de los tejidos del diente. Por esto es importante seguir avanzando en la investigación clínica de este compuesto en complementación con dosis terapéuticas de flúor (1450 ppm) y analizar toda la potencialidad del efecto antibiopelículas y remineralizador de una combinación como esta. De todas maneras, es necesario en un primera etapa poder avanzar en determinar rangos terapéuticos, rangos de toxicidad, sustentividad, tiempos de exposición, etc.

9. CONCLUSIONES

En este estudio se analizaron diversos artículos en donde se identificaron un total de 17 inhibidores capaces de inhibir el sistema *quorum sensing* de *S. mutans*, particularmente la vía ComABCDE y la vía LuxS, e interferir en sus mecanismos de patogenicidad.

Dentro de los mecanismo de acción descritos el más convenientes se encuentran inhibir la liberación del autoinductor de la vía ComABCDE (CSP) o quelar el autoinductor en la vía LuxS (AI-2) ya que en este último la producción del autoinductor es producto de un proceso vital para la célula bacteriana. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para determinar el alcance de la inhibición de esta vía de señalización y sus efectos en el resto de las bacterias orales que conforman la biopelícula dental.

Respecto al potencial uso intraoral se hacen necesarios más estudios donde se evalúen mayores tiempos de exposición, además de la realización de estudios *in vivo* y estudios clínicos. A pesar de esto existen reportes prometedores, como el realizado con DMTU el cual, además, presenta un efecto sinérgico con el flúor lo que lo hace un excelente candidato como compuesto preventivo y terapéutico en el manejo de lesiones de caries.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5721–5732.
- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T., Richards, V. P., Brady, L. J., & Lemos, J. A. (2018). Biology of Oral Streptococci. *Microbiology spectrum*, 6(5).
- Ahn, S. J., Wen, Z. T., & Burne, R. A. (2006). Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159. *Infection and immunity*, 74(3), 1631–1642.
- Adil, M., Singh, K., Verma, P. K., & Khan, A. U. (2014). Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(4), 286–292.
- Aulton, M.E. (2004) *Farmacía. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. 2^o edición. Elsevier.
- Balasubramanian, A. R., Vasudevan, S., Shanmugam, K., Lévesque, C. M., Solomon, A. P., & Neelakantan, P. (2021). Combinatorial effects of trans-cinnamaldehyde with fluoride and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*. *Journal of applied microbiology*, 130(2), 382–393.
- Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E., & Silverman, M. R. (1993). Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular microbiology*, 9(4), 773–786.
- Blango, M. G., & Mulvey, M. A. (2009). Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations. *Current opinion in microbiology*, 12(2), 177–181.
- Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current pharmaceutical design*, 21(1), 5–11.

Chung, W. O., Park, Y., Lamont, R. J., McNab, R., Barbieri, B., & Demuth, D. R. (2001). Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. *Journal of bacteriology*, 183(13), 3903–3909.

Dong, Y. M., Pearce, E. I., Yue, L., Larsen, M. J., Gao, X. J., & Wang, J. D. (1999). Plaque pH and associated parameters in relation to caries. *Caries research*, 33(6), 428–436.

Eguchi, Y., Kubo, N., Matsunaga, H., Igarashi, M., & Utsumi, R. (2011). Development of an antivirulence drug against *Streptococcus mutans*: repression of biofilm formation, acid tolerance, and competence by a histidine kinase inhibitor, walkmycin C. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(4), 1475–1484.

FDI, World Dental Federation (2015). El desafío de las enfermedades Bucodentales, Una llamada a la acción global. *Atlas de la salud bucodental, segunda edición*.

Fejerskov, O., & Kidd, E. A. M. (2009). *Dental caries: The disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell Munksgaard.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633.

García, P. (2018). Producción de autoinductor-2 por *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 y sus efectos en la adhesión y formación de biopelículas. *Tesis de título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile*.

García-Contreras, R., Maeda, T. & Wood, TK. (2016). ¿Se puede seleccionar la resistencia contra la interferencia de detección de *quórum*? *La revista ISME*. 10 (1), 4–10.

Hamada, S., Koga, T., & Ooshima, T. (1984). Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *Journal of dental research*, 63(3), 407–411.

Hasan, S., Danishuddin, M., Adil, M., Singh, K., Verma, P. K., & Khan, A. U. (2012). Efficacy of *E. officinalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus*

mutans: a novel and alternative approach to suppress *quorum-sensing* mechanism. *PloS one*, 7(7), e40319.

Hardie, K. R., & Heurlier, K. (2008). Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. *Nature reviews. Microbiology*, 6(8), 635–643.

Håvarstein, L. S., Diep, D. B., & Nes, I. F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular microbiology*, 16(2), 229–240.

He, Z., Wang, Q., Hu, Y., Liang, J., Jiang, Y., Ma, R., Tang, Z., & Huang, Z. (2012). Use of the *quorum sensing* inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its *luxS* mutant strain. *International journal of antimicrobial agents*, 40(1), 30–35.

Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., & Maeda, N. (2009). Bacterial interactions in dental biofilm development. *Journal of dental research*, 88(11), 982–990.

Hossain, M. S., & Biswas, I. (2012). An extracellular protease, SepM, generates functional competence-stimulating peptide in *Streptococcus mutans* UA159. *Journal of bacteriology*, 194(21), 5886–5896.

Hooth, M. J., Sills, R. C., Burka, L. T., Haseman, J. K., Witt, K. L., Orzech, D. P., Fuciarelli, A. F., Graves, S. W., Johnson, J. D., & Bucher, J. R. (2004). Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated trans-cinnamaldehyde in rats and mice. *Food and chemical toxicology*, 42(11), 1757–1768.

Ishii, S., Yano, T., & Hayashi, H. (2005). Expression and Characterization of the Peptidase Domain of *Streptococcus pneumoniae* ComA, a Bifunctional ATP-binding Cassette Transporter Involved in Quorum Sensing Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4726–4731.

Ishii, S., Fukui, K., Yokoshima, S., Kumagai, K., Beniyama, Y., Kodama, T., Fukuyama, T., Okabe, T., Nagano, T., Kojima, H., & Yano, T. (2017). High-throughput Screening of Small Molecule Inhibitors of the *Streptococcus Quorum-sensing* Signal Pathway. *Scientific reports*, 7(1), 4029.

Jenkinson H. F. (2011). Beyond the oral microbiome. *Environmental microbiology*, 13(12), 3077–3087.

Kang, M., Kim, S., Kim, H., Song, Y., Jung, D., Kang, S., Seo, J. H., Nam, S., & Lee, Y. (2019). Calcium-Binding Polymer-Coated Poly(lactide- co-glycolide) Microparticles for Sustained Release of *Quorum Sensing* Inhibitors to Prevent Biofilm Formation on Hydroxyapatite Surfaces. *ACS applied materials & interfaces*, 11(8), 7686–7694.

Kasper, S. H., Samarian, D., Jadhav, A. P., Rickard, A. H., Musah, R. A., & Cady, N. C. (2014). S-aryl-L-cysteine sulphoxides and related organosulphur compounds alter oral biofilm development and AI-2-based cell-cell communication. *Journal of applied microbiology*, 117(5), 1472–1486.

Kaur, G., Balamurugan, P., Uma Maheswari, C., Anitha, A., & Princy, S. A. (2016). Combinatorial Effects of Aromatic 1,3-Disubstituted Ureas and Fluoride on In vitro Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 861.

Kaur, G., Balamurugan, P., & Princy, S. A. (2017). Inhibition of the *Quorum Sensing* System (ComDE Pathway) by Aromatic 1,3-di-m-tolylurea (DMTU): Cariostatic Effect with Fluoride in Wistar Rats. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 313.

Kim, H. J., Lee, J. H., Ahn, D. U., & Paik, H. D. (2020). Anti-Biofilm Effect of Egg Yolk Phosvitin by Inhibition of Biomass Production and Adherence Activity against *Streptococcus mutans*. *Food science of animal resources*, 40(6), 1001–1013.

Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr, Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., & Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*, 42, 47–79.

Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr, Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature reviews. Microbiology*, 8(7), 471–480.

Leid, J. G., Willson, C. J., Shirliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., & Jeffers, A. K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *Journal of immunology*, 175(11), 7512–7518.

Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology spectrum*, 7(1), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.

Li, X., Yin, L., Ramage, G., Li, B., Tao, Y., Zhi, Q., Lin, H., & Zhou, Y. (2019). Assessing the impact of curcumin on dual-species biofilms formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *MicrobiologyOpen*, 8(12), e937.

Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., Maltz, M., Manton, D. J., Martignon, S., Martinez-Mier, E. A., Pitts, N. B., Schulte, A. G., Splieth, C. H., Tenuta, L., Ferreira Zandona, A., & Nyvad, B. (2020). Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries research*, 54(1), 7–14.

Marsh P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 2), 279–294.

Merritt, J., Kreth, J., Shi, W., & Qi, F. (2005). LuxS controls bacteriocin production in *Streptococcus mutans* through a novel regulatory component. *Molecular microbiology*, 57(4), 960–969.

Middha, S. K., Goyal, A. K., Lokesh, P., Yardi, V., Mojamdar, L., Keni, D. S., Babu, D., & Usha, T. (2015). Toxicological Evaluation of *Embllica officinalis* Fruit Extract and its Anti-inflammatory and Free Radical Scavenging Properties. *Pharmacognosy magazine*, 11(Suppl 3), S427–S433.

MINSAL (2011). Metas 2011-2020, Elige vivir sano. Estrategia Nacional de Salud para el cumplimiento de los objetivos sanitarios de la década 2011-2020. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.

Mohammadi Nejad, S., Özgüneş, H., & Başaran, N. (2017). Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 14(2), 201–206.

Muras, A., Mayer, C., Romero, M., Camino, T., Ferrer, M. D., Mira, A., & Otero, A. (2018). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by extracts of *Tenacibaculum* sp. 20J, a bacterium with wide-spectrum quorum quenching activity. *Journal of oral microbiology*, 10(1), 1429788.

National Toxicology Program (2004). NTP toxicology and carcinogenesis studies of trans-cinnamaldehyde (CAS No. 14371-10-9) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). *National Toxicology Program technical report series*, (514), 1–281.

Ng, W. L., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, 43, 197–222.

Nyvad, B., & Kilian, M. (1990). Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries research*, 24(4), 267–272.

Ojeda, J.C., Oviedo, E., & Salas, L.A. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES Odontología*, 26(1), 44-56

Okada, A., Igarashi, M., Okajima, T., Kinoshita, N., Umekita, M., Sawa, R., Inoue, K., Watanabe, T., Doi, A., Martin, A., Quinn, J., Nishimura, Y., & Utsumi, R. (2010). Walkmycin B targets Walk (YycG), a histidine kinase essential for bacterial cell growth. *The Journal of antibiotics*, 63(2), 89–94.

Ou, M., & Ling, J. (2017). Norspermidine changes the basic structure of *S. mutans* biofilm. *Molecular medicine reports*, 15(1), 210–220.

Palmer, R. J., Jr, Kazmerzak, K., Hansen, M. C., & Kolenbrander, P. E. (2001). Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. *Infection and immunity*, 69(9), 5794–5804.

Palomer, L. (2006) Caries dental en el niño. Una enfermedad contagiosa. *Chile, Rev Chil Pediatr* 77:56-60.

Petersen P. E. (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community dentistry and oral epidemiology*, 31 Suppl 1, 3–23.

Pine, C. M., Adair, P. M., Nicoll, A. D., Burnside, G., Petersen, P. E., Beighton, D., Gillett, A., Anderson, R., Anwar, S., Brailsford, S., Broukal, Z., Chestnutt, I. G., Declerck, D., Ping, F. X., Ferro, R., Freeman, R., Gugushe, T., Harris, R., Lin, B., Lo, E. C., Whelton, H. (2004). International comparisons of health inequalities in childhood dental caries. *Community dental health*, 21(1 Suppl), 121–130.

Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17030.

Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., & Daudé, D. (2018). Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. *Frontiers in pharmacology*, 9, 203.

Rickard, A. H., Palmer, R. J., Jr, Blehert, D. S., Campagna, S. R., Semmelhack, M. F., Eglund, P. G., Bassler, B. L., & Kolenbrander, P. E. (2006). Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Molecular microbiology*, 60(6), 1446–1456.

Rojas, I. (2012). Prevalencia de caries dental y factores de riesgo asociados. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 41(4), 379-384.

Santos, B., & Guerrero, M. D. (1994). *Administración de Medicamentos: Teoría y Práctica*. Diaz De Santos.

Sarduy, L., & González, M. E. (2016). La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica*, 20(3), 167-175.

Sebastián-Domingo, J. J., & Sánchez-Sánchez, C. (2018). From the intestinal flora to the microbiome. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(1), 51–56

Senadheera, D., & Cvitkovitch, D. G. (2008). *Quorum sensing* and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Advances in experimental medicine and biology*, 631, 178–188.

Senpuku, H., Mohri, S., Mihara, M., Arai, T., Suzuki, Y., & Saeki, Y. (2019). Effects of 7S globulin 3 derived from the adzuki bean [*Vigna angularis*] on the CSP- and eDNA- dependent biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology*, 102, 256–265.

Silva, T. M., Andersson, S., Sukumaran, S. K., Marques, M. P., Persson, L., & Oredsson, S. (2013). Norspermidine and novel Pd(II) and Pt(II) polynuclear complexes of norspermidine as potential antineoplastic agents against breast cancer. *PloS one*, 8(2), e55651.

Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., & Rajnish, K. N. (2021). Bacterial exopolysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 19(1), 140.

Spellerberg, B., & Brandt, C. (2015). *Streptococcus*. *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition*. Chapter 22:383-402.

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

Suzuki, Y., Nagasawa, R., & Senpuku, H. (2017). Inhibiting effects of fructanase on competence-stimulating peptide-dependent *quorum sensing* system in *Streptococcus mutans*. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 23(9), 634–641.

Soleimani, V., Sahebkar, A., & Hosseinzadeh, H. (2018). Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytotherapy research*, 32(6), 985–995.

Sztajer, H., Lemme, A., Vilchez, R., Schulz, S., Geffers, R., Yip, C. Y., Levesque, C. M., Cvitkovitch, D. G., & Wagner-Döbler, I. (2008). Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the *luxS* mutation. *Journal of bacteriology*, *190*(1), 401–415.

Swift, S., Downie, J. A., Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Salmond, G. P., & Williams, P. (2001). *Quorum sensing* as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Advances in microbial physiology*, *45*, 199–270.

Takahashi, N., & Nyvad, B. (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries research*, *42*(6), 409–418.

Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of dental research*, *90*(3), 294–303.

Tanzer, J. M., Livingston, J., & Thompson, A. M. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of dental education*, *65*(10), 1028–1037.

Vijayakumar, A., Sarveswari, H. B., Vasudevan, S., Shanmugam, K., Solomon, A. P., & Neelakantan, P. (2021). Baicalein Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilms and Dental Caries-Related Virulence Phenotypes. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *10*(2), 215.

Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C. M., & Hardie, K. R. (2005). Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, *3*(5), 383–396.

Verbeke, F., De Craemer, S., Debunne, N., Janssens, Y., Wynendaele, E., Van de Wiele, C., & De Spiegeleer, B. (2017). Peptides as *Quorum Sensing* Molecules: Measurement Techniques and Obtained Levels *In vitro* and *In vivo*. *Frontiers in neuroscience*, *11*, 183.

Villaruel, R. (2018). Participación de *Quorum Sensing*, mediante autoinductor-2, en la adhesión y desarrollo de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646. *Tesis de título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile*.

Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). *Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annual review of cell and developmental biology*, 21, 319–346.

Wen, Z. T., & Burne, R. A. (2004). LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 186(9), 2682–2691.

Whatmore, A. M., Barcus, V. A., & Dowson, C. G. (1999). Genetic diversity of the streptococcal competence (com) gene locus. *Journal of bacteriology*, 181(10), 3144–3154.

Whitmore, S. E., & Lamont, R. J. (2011). The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Molecular microbiology*, 81(2), 305–314.

World Health Organization (1987): Oral health surveys. Basic methods. 3rd. Geneva, Suiza WHO.

Wright, C. J., Burns, L. H., Jack, A. A., Back, C. R., Dutton, L. C., Nobbs, A. H., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Molecular oral microbiology*, 28(2), 83–101.

Zeng, H., Liu, J., & Ling, J. (2017). Efflux inhibitor suppresses *Streptococcus mutans* virulence properties. *FEMS microbiology letters*, 364(7).

Zhang, Z., Liu, Y., Lu, M., Lyu, X., Gong, T., Tang, B., Li, Y. (2020). *Rhodiola rosea* extract inhibits the biofilm formation and the expression of virulence genes of cariogenic oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 104762.

Zhang, Z., Zeng, J., Zhou, X., Xu, Q., Li, C., Liu, Y., Zhang, C., Wang, L., Zeng, W., & Li, Y. (2021). Activity of *Ligustrum robustum* (Roxb.) Blume extract against the biofilm formation and exopolysaccharide synthesis of *Streptococcus mutans*. *Molecular oral microbiology*, 36(1), 67–79.

Zhao, J., Quan, C., Jin, L., & Chen, M. (2018). Production, detection and application perspectives of quorum sensing autoinducer-2 in bacteria. *Journal of biotechnology*, 268, 53–60.

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

11. ANEXOS

ANEXO 1



CARTA – CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRI-ODO

Santiago, 8 de diciembre de 2020

Mat.: Asigna Código DIFO: 2020/002

Dra. Claudia Lefimil V.
 Investigador Responsable Propuesta PRI-ODO
 Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
 Facultad de Odontología
PRESENTE

Estimada Dra. Lefimil:

Informo a usted que con fecha de Registro de Inscripción 8 de enero de 2020, el Proyecto de Investigación PRI-ODO titulado: “Role of LuxS and autoinducer-2 in the interaction between *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium dentium*, two cariogenic microorganisms”, ha sido asignado con el siguiente Código de Inscripción en la Dirección de Investigación:

PRI-ODO 2020 CÓDIGO DIFO: 2020/002

Este Proyecto cuenta con:

1. Carta Director de Departamento – IR.	SI	NO	N/A
2. Certificado de Aprobación del Comité de Ética de la Facultad.	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 1 año, por lo tanto:

Fecha de Entrega Informe Final:	8 de enero de 2021
---------------------------------	--------------------

Deseándole el mayor de los éxitos, se despide cordialmente,



PROF. DR. ALFREDO MOLINA BERRÍOS
 DIRECTOR (S) INVESTIGACIÓN
 FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

AMB/rcm.