



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

“Efecto del exceso y concentración limitante de azúcar en biopelículas duales de *Streptococcus sanguinis* y un aislado clínico oral de *Candida albicans*”.

Elías Enrique Martínez Casanova

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

TUTORA PRINCIPAL
Dra. Carla Lozano M.

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/08
y FIOUCH 2022/02
Santiago, Chile
2024



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

“Efecto del exceso y concentración limitante de azúcar en biopelículas duales de *Streptococcus sanguinis* y un aislado clínico oral de *Candida albicans*”.

Elías Enrique Martínez Casanova

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

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Carla Lozano M.

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/08

y FIOUCH 2022/02

Santiago, Chile

2024

Dedicatoria

Dedicado a Elsa y Elías. Con amor.

Agradecimientos

Quiero partir agradeciendo a mis padres, Elsa y Elías, que durante toda mi vida me han guiado, acompañado y amado. Agradecerles por la persona que soy hoy y por la que seré mañana, porque siento que soy el resultado de todas sus enseñanzas, cariños y abrazos. Gracias por estar para mí en cada instante e incluso cuando menos pensaba que los necesitaba. Son lo más importante para mí y este trabajo, aparte de concluir una etapa de mi vida y dar paso a otra, es también el resultado de años de su esfuerzo y sacrificio, de levantarse temprano en las heladas mañanas del invierno y esperar a que llegara en la noche. Nada de estos años hubiera sido lo mismo y agradezco/agradeceré cada día por tenerlos en mi vida. Las palabras quedan cortas, pero quiero que sepan que los amo mucho.

También agradecer a mi tío Juan, quién también es parte de mi formación como persona y me enseñó a ser fiel a lo que uno piensa, en hacer las cosas con el corazón y dar todo de uno.

Agradecer a mis amigos y compañeros por cada consejo, conversación y risas que hemos compartido, que me han ayudado a sobrellevar estos años de carrera (una larga carrera).

Dar las gracias a Natalia y su familia, que, en este último tramo de la carrera, me han apoyado y entregado su cariño y amor en todo momento.

Gracias a la doctora (profe) Carla Lozano, por todos estos años en que tuvo que aguantarme y “empujarme” en la realización de este trabajo. Gracias por cada instante de su tiempo en que dejó de lado otras cosas por acompañarme, enseñarme y motivarme de cierta forma a ser una mejor persona y estudiante. Gracias por ser cómo es, una luz dentro de esta Universidad.

Dar gracias al Dr. Rodrigo Giacaman, a Natalia García, al proyecto PRI-ODO 2020/08 y FIOUCH 2022/02 por permitirme participar en esta línea de investigación con esta tesis.

Finalmente agradecer al cuerpo académico, a cada doctor, profesor y funcionario con que compartí, y participó en mi formación como cirujano dentista y más importante, mi formación como persona.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Caries Dental y Epidemiología	3
Microbiología Oral	4
Levaduras del Género <i>Candida</i>	6
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	9
HIPÓTESIS.	10
OBJETIVOS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
METODOLOGÍA.	11
Parámetros Biológicos:.....	13
Parámetros Físico-químicos:.....	14
RESULTADOS.....	16
Parámetros Biológicos:.....	16
Parámetros Físico/Químicos:	19
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXOS	45

RESUMEN

Introducción: *Streptococcus sanguinis* es una bacteria comensal de la biopelícula dental, está asociada a dientes libres de caries y es capaz de producir bacteriocina y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), para mantener la ecología de la cavidad oral. *Candida albicans* es una levadura presente tanto en salud oral como caries dental, se ha observado que tiene la capacidad de transicionar desde una célula oval a una forma más patogénica e invasiva llamada hifa bajo condiciones ambientales como temperatura, pH y nutrientes disponibles en el medio. Se desconoce el rol que presenta este hongo en salud o en caries. Hasta ahora, no se ha descrito cómo ambos microorganismos interactúan y/o coexisten en la biopelícula en condiciones de exceso (condición cariogénica) y limitantes de azúcar (negativo para caries).

Objetivo: Determinar el efecto del exceso y limitación de azúcar en parámetros biológicos/físico-químicos de biopelículas duales de *S. sanguinis* y *C. albicans*.

Metodología: Se usó un modelo de caries *in vitro* utilizando bloques de esmalte de bovino para la formación de biopelículas duales entre *S. sanguinis* SK36 y *C. albicans* (aislado clínico oral). Éstas fueron sometidas durante 5 días, 3 veces/día durante 5 min a una solución de 10% sacarosa o 0,9% NaCl (exceso y limitación de azúcar, respectivamente). Se evaluaron parámetros físico-químicos (pH, cuantificación de H_2O_2 , desmineralización del esmalte) y biológicos (viabilidad de ambos microorganismos y cuantificación de hifas de la levadura), también se tomaron microfotografías electrónicas de barrido (SEM), las cuales fueron analizadas descriptivamente. Los ensayos fueron realizados en dos experimentos independientes. Los datos se analizaron con estadística paramétrica y no paramétrica.

Resultados: En exceso de azúcar, la viabilidad y número de hifas de *C. albicans* fue mayor que en NaCl ($p < 0,05$), no presentando diferencias la viabilidad de la bacteria. Así también, los valores de pH en la condición de exceso de azúcar fueron significativos y levemente ácidos versus a la condición de NaCl ($p < 0,05$). La desmineralización del esmalte fue mayor en exceso de azúcar que en NaCl ($p < 0,05$). La producción de H_2O_2 no presentó diferencias significativas en ambas condiciones experimentales ($p > 0,05$).

Conclusiones: El exceso de azúcar favorece el potencial patobionte de *C. albicans*, ya que es capaz de regular su metabolismo y usar el azúcar del medio para aumentar su viabilidad celular y su filamentación. Además, en esta condición, *S. sanguinis* tendría un efecto protector, previniendo la caída pronunciada de pH y podría estimular el desarrollo de hifas del hongo.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad crónica, no transmisible, dinámica, mediada por el *biofilm* y modulada por la dieta, lo que resulta en la pérdida de los tejidos duros dentales. Está determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. Como consecuencia de este proceso, se desarrollan las lesiones de caries (Revisado en Machiulskiene y cols., 2020).

Las lesiones de caries no tratadas en dentición permanente representan el 35% de las condiciones médicas más prevalentes, afectando a 2,4 billones de personas a nivel mundial (Revisado en Pitts y cols., 2017). A nivel nacional, existe una prevalencia del 54,6% de lesiones de caries cavitadas (Revisado en MINSAL, 2018).

En condición de enfermedad de caries, es decir, en un medio oral cariogénico, donde existe una alta cantidad de azúcares fermentables, destacando la sacarosa como el azúcar más cariogénico, se ha observado que existe un desequilibrio en la composición microbiana, aumentando el crecimiento de las especies acidogénicas y acidúricas (Revisado en Pitts y cols., 2017).

Dentro de los microorganismos que han sido asociados a la enfermedad de caries pero que se desconoce su rol, se encuentra *C. albicans*, que es la especie más prevalente del género *Candida*, la cual es un microorganismo patobionte que actúa como comensal en la cavidad oral en salud, siendo capaz de regular su metabolismo según los nutrientes disponibles en el medio (Revisado en d'Enfert y cols., 2021). Se caracteriza porque típicamente crece en forma de levadura (forma ovalada y generalmente en gemación), pero puede transicionar a una forma filamentosa (hifa) más patogénica. Por otra parte, en las especies asociadas a salud oral se encuentra *Streptococcus sanguinis*, uno de los comensales más abundantes, que contribuye a la homeostasis del *biofilm* oral y ha desarrollado mecanismos para prevenir el daño al hospedero producido como consecuencia de su crecimiento (Revisado en Kreth y cols., 2017).

Escasa es la evidencia que interpreta lo que ocurre entre estos microorganismos en condiciones de salud oral respecto a cómo coexisten y coagregan en el *biofilms* dental. Por tanto, un estudio que permita evaluar cómo responden ambos microorganismos en un *biofilms* dual y esbozando el tipo de

interacción biológica, química o metabólica nos ayudaría a comprender lo que significa el rol de *C. albicans* en un *biofilms* con una bacteria comensal.

El presente trabajo propone analizar el efecto del exceso de azúcar sobre parámetros biológicos (viabilidad celular, filamentación, capacidad de formar biopelículas), así como parámetros físico-químicos (pH o acidogenicidad, producción de H₂O₂ y desmineralización del esmalte dental) en un *biofilms* dual de *C. albicans* y *S. sanguinis* utilizando un modelo *in vitro* de caries.

MARCO TEÓRICO

Caries Dental y Epidemiología

La caries dental es una enfermedad crónica, no transmisible, dinámica, mediada por el *biofilms* y modulada por la dieta, lo que resulta en la pérdida de los tejidos duros dentales. Está determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. Como consecuencia de este proceso, se desarrollan las lesiones de caries (Revisado en Machiulskiene y cols., 2020). Es una de las enfermedades más prevalentes en la mayoría de los países industrializados, afectando del 60-90% de los niños y a una gran parte de la población adulta. Lesiones de caries no tratadas en dentición permanente representan el 35% de las condiciones médicas más prevalentes, afectando a 2,4 billones de personas a nivel mundial (Revisado en Pitts y cols., 2017). A nivel nacional, existe una prevalencia del 54,6% de lesiones de caries cavitadas (MINSAL, 2018), y donde se ven involucrados factores como el nivel socioeconómico, educación, actitudes y el comportamiento de higiene oral y dieta.

Se ha descrito que personas con un bajo nivel educacional tienden a verse más afectadas por la enfermedad de caries en comparación con aquellas personas con una mejor situación económica que presentan una menor proporción de lesiones de caries (Niskanen y cols., 2020). También están los factores microambientales orales, como la exposición a fluoruros, pH, la composición y el flujo salival, en conjunto con la capacidad tampón, de los cuales se refiere que se encuentran disminuidos en niños que presentan lesiones de caries en comparación con aquellos libres de caries (Pyati y cols., 2018). Finalmente, los factores que están directamente relacionados con el desarrollo de la lesión de caries son: diente, tiempo, dieta (cantidad, frecuencia y composición) y microbiota (Fejerskov y cols., 1997; Giacaman y cols., 2022).

A fines del siglo XIX, era aceptada como la causa principal de la enfermedad de caries el crecimiento aumentado de bacterias en *biofilms* dental

(Revisado en Philip y cols., 2018), pero es en el año 1976, cuando Loesche planteó que la enfermedad de caries era de tipo “infecciosa” y causada por una bacteria específica (Loesche, 1976). Esta bacteria junto a otras del mismo tipo pertenecen a un grupo de bacterias Gram-positivo, acidogénicas y acidúricas, actualmente denominado mutans streptococci, de las cuales destacan *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, como las especies más comunes en humanos (Philip y cols., 2018).

Actualmente, es reconocido que los postulados de Köch acerca de enfermedades infecciosas no son aplicables para enfermedades basadas en disbiosis polimicrobiana, que hace referencia al desequilibrio de los microorganismos presentes en nichos ecológicos, como son caries dental y periodontitis (Philip y cols., 2018). En el año 2014 se describió que *S. mutans*, probablemente el microorganismo más estudiado con relación a la enfermedad de caries, se encuentra en una proporción de menos del 1% de las bacterias encontradas tanto en lesiones dentinarias como en lesiones de esmalte (Simón-Soro y cols., 2014), cuestionando esta concepción pasada de la enfermedad.

Microbiología Oral

El microbioma oral es altamente diverso, más de 700 especies están presentes en la cavidad oral y la mayoría de ellas son nativas (Palmer, 2014). Está conformado por bacterias, hongos, virus, arqueas y protozoos.

Los diferentes microambientes que existen en la cavidad oral, como las superficies mucosas y dentarias, actúan como nichos ecológicos para la formación de las comunidades microbianas. Los microorganismos que colonizan las superficies de los dientes tienden a formar comunidades multiespecies embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS en inglés), conformando la biopelícula o el *biofilms* dental (Lamont y cols., 2018; Machiulskiene, y cols., 2020).

Las formas más comunes de interacciones entre los microorganismos son aquellas sinérgicas y antagónicas, dentro de las primeras destacan aquellas interacciones físicas o de la arquitectura del *biofilms*, tales como la co-adhesión - la adherencia de células planctónicas a otros microorganismos ya fijados a una superficie, lo que facilita la formación de *biofilms* multiespecies (Kolenbrander y cols., 2011). Se ha demostrado que mediante señalización célula-célula, las células microbianas son capaces de comunicarse y de responder a células vecinas dentro del *biofilm* mediante moléculas efectoras con capacidad de difusión y de pequeño tamaño. La proximidad celular dentro del *biofilms* también genera las condiciones ideales para la transferencia horizontal de genes, lo que permite a las bacterias orales disponer de un inmenso metagenoma para su adaptación a los cambios que ocurran en el microambiente oral (Marsh y Zaura, 2017). Por otro lado, dentro de las interacciones antagónicas, numerosos estudios destacan la producción de compuestos como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácidos orgánicos, enzimas y fagos líticos, que dan herramientas a los microorganismos para competir entre ellos (Marsh y Zaura, 2017).

En salud oral, las interacciones microbianas están asociadas a una baja cantidad de ácidos y una compensación en la producción de sustancias alcalinas, resultando en un medio con un pH neutro. Tal ambiente promueve el crecimiento de especies asociadas a salud, destacando los géneros *Actinomyces*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Granulicatella* y *Streptococcus*, al mismo tiempo restringe el crecimiento de especies asociadas con la enfermedad de caries, de las cuales los grupos más estudiados son mutans streptococci y lactobacilli (Revisado en Kreth y cols., 2017).

Streptococcus sanguinis es una especie Gram-positivo, no móvil, catalasa negativa, dentro de las especies de *Streptococcus* está asociada al mismo grupo que *S. gordonii* y hasta el momento ha sido aislada solamente en humanos. Es descrita como la especie comensal más abundante, contribuye a la homeostasis del *biofilms* oral y ha desarrollado mecanismos para prevenir el daño al hospedero producido como consecuencia de su crecimiento (Revisado en Kreth y cols., 2017). Actúa como colonizador primario de la superficie del diente, facilitando la

colonización posterior de otras especies del *biofilms* oral (Revisado en Kreth y cols., 2017), y lo hace con ayuda de la enzima glucosiltransferasa S que produce glucanos solubles en agua. Interacciones célula-célula y metabólicas entre *S. sanguinis* y otros miembros de la comunidad son determinantes para la ecología y la salud oral, *S. sanguinis* es capaz de catabolizar arginina y producir amonio (mediante el Sistema Arginina Deiminasa (ADS)), favoreciendo un *biofilms* dental con un pH cercano al neutro. Además, se ha descrito que en condiciones de salud oral, *S. sanguinis* produce H₂O₂ y bacteriocinas para mantener la ecología de la cavidad oral, suprimiendo el sobrecrecimiento de bacterias patobiontes (Sanz y cols., 2017; Kreth y cols., 2017). Una de las enzimas responsables de producir H₂O₂ ha sido identificada como piruvato oxidasa y es codificada por el gen *spxB* (Kreth y cols., 2017).

En condición de enfermedad de caries, es decir, en un medio oral cariogénico, donde existe una alta cantidad de azúcares fermentables, destacando la sacarosa como el azúcar más cariogénico, se ha observado que existe un desequilibrio en la composición microbiana, aumentando el crecimiento de las especies acidogénicas y acidúricas, y la formación de EPS (solubles e insolubles en agua) que sirven como andamiajes para la formación y consolidación de estos *biofilms*, contribuyendo en el establecimiento de un ambiente ácido mediante una retroalimentación positiva que favorece la desmineralización de los tejidos duros dentarios (Sanz y cols., 2017).

Levaduras del Género *Candida*

Otros microorganismos de la cavidad oral han sido asociados a la microbiología de la enfermedad de caries, como lo son hongos del tipo levaduras del género *Candida*, las cuales han sido aisladas de muestras de saliva en niños preescolares, siendo la más prevalente *C. albicans* y, donde además se observó una mayor cantidad de ésta en aquellos que presentaban lesiones de caries más

severas (Lozano y cols., 2017). de Abreu y cols. (2016) observaron que *C. albicans* aislada de niños con o sin caries inducían la desmineralización del esmalte.

C. albicans es la especie más prevalente del género, es un microorganismo patobionte que actúa como comensal en la cavidad oral en salud, siendo capaz de regular su metabolismo según los nutrientes disponibles en el medio (Revisado en d'Enfert y cols., 2021). Se caracteriza porque típicamente crece en forma de levadura (forma ovalada y generalmente en gemación), pero puede transicionar a una forma filamentosa (hifa) bajo la influencia de señales ambientales, como alteraciones en la temperatura, pH y nutrientes disponibles (Figura 1). Esta forma de cambiar de un estado levaduriforme a hifa y viceversa es considerada la forma más patogénica de esta levadura, facilitando la infección y la formación de *biofilms* (Revisado en Leito y cols., 2009).

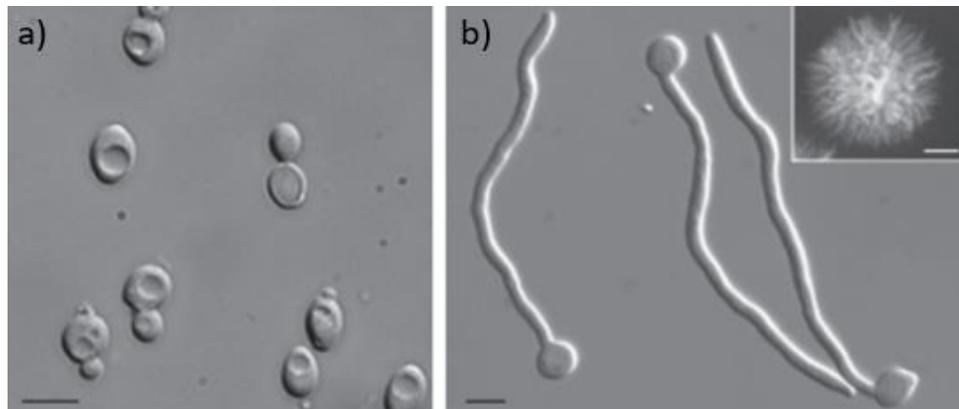


Figura 1: Morfología de *C. albicans*. A) Estado levaduriforme. B) Estado hifal. Revisado en Sudbery (2011).

C. albicans es capaz de interactuar con las diferentes especies que componen la microbiota oral, puede coagregar con *S. sanguinis* en salud y con *S. mutans* en condiciones cariogénicas, mediante interacciones célula-célula aumentando la biomasa del conjunto (Revisado en Pereira y cols., 2018).

La secreción de glucosiltransferasas, como GtfS por *S. sanguinis*, capaz de producir glucanos solubles en agua, y GtfC, GtfB y GtfD por parte de *S. mutans* que favorecen la formación de glucanos solubles e insolubles en agua, facilitan la formación de *biofilms* en condiciones de salud y caries, respectivamente (Koo y

cols., 2009). Se describió que estas enzimas se unen fácilmente a formas levaduriformes de *C. albicans*, y en el caso de GtfB, ésta aumenta su expresión cuando *S. mutans* está asociado a esta levadura (Yoshida y cols., 2014; Falsetta y cols., 2014; Pereira y cols., 2018). Aunque se ha descrito la asociación de *C. albicans*, *S. mutans* y caries, más estudios son necesarios para dilucidar el rol de la levadura en esta enfermedad. En tanto, aún se desconocen aspectos relevantes de la interacción comensal de esta levadura con *S. sanguinis* en salud oral.

La secreción de H_2O_2 por parte de *S. sanguinis* produce un efecto bacteriostático en *S. mutans*, en el caso de *C. albicans* podría mantener o disminuir la viabilidad celular. Se ha descrito que el estrés oxidativo, podría actuar reprimiendo la transición morfológica de levadura a hifa (Revisado en Biswas y cols., 2007).

Este hongo dispone de diferentes mecanismos para hacer frente al estrés oxidativo, por ejemplo, mediante la inducción de genes productores de catalasa (*CAT1*), capaz de degradar el H_2O_2 ; la síntesis de antioxidantes como el glutatión y reparando el daño oxidativo del ADN, proteínas y lípidos (Revisado en d'Enfert y cols., 2021).

Por otro lado, *C. albicans* sintetiza farnesol, molécula derivada del ácido farnesoico, que actúa en la comunicación célula-célula (*quorum sensing*), atenúa el estrés oxidativo, y cumple un rol fundamental en la inhibición de la transición yema – hifa en altas densidades celulares, sin evitar la elongación de hifas preexistentes ni afectando el crecimiento de la población (Hornby y cols., 2001; Vila y cols., 2019; Sebaa y cols., 2019).

Por lo tanto, podría plantearse que el H_2O_2 tiene un efecto inhibitorio en la filamentación y capacidad que posee *C. albicans* de formar *biofilms* con microorganismos comensales, en condición de salud (es decir, en concentraciones limitantes de azúcar). Por otro lado, estudios señalan que un pH neutro o alcalino del medio promueve el desarrollo de formas filamentosas de *C. albicans*, no así un pH ácido, el cuál es característico de un medio cariogénico (es decir, en condiciones de exceso de azúcar), que debería inhibir la formación de éstas en especies de *Candida* spp. (Revisado en Chen y cols., 2020).

De esta forma, toma relevancia realizar un estudio que permita evaluar lo que ocurre en los *biofilms* que componen esta levadura y bacterias comensales como *S. sanguinis*, tal que permita observar el efecto de la cantidad de azúcar disponible en el medio, ya sea en la viabilidad celular, en la capacidad de formar biopelículas tanto para *S. sanguinis* como para *C. albicans* (y filamentación para esta última), lo que corresponderían a parámetros biológicos, así como también efectos en el pH (acidogenicidad), producción de H₂O₂ y desmineralización del esmalte dental (parámetros físico-químicos) en *biofilms* duales, utilizando un modelo *in vitro* de caries. Los experimentos propuestos en este trabajo son preliminares y nos ayudaron a esbozar en parte lo que significa el rol de *C. albicans* como comensal en salud oral y como patobionte en caries.

En este estudio utilizamos un aislado clínico oral de *C. albicans*, la cual proviene de saliva de sujeto libre de caries. Según lo que se ha reportado en la literatura, el uso de aislados clínicos obtenidos desde muestras biológicas presentan características bioquímicas y fisiológicas distintas a las cepas de referencia, de esta forma buscamos presentar resultados que se asemejen en lo posible a la situación clínica.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Qué efecto tiene el exceso y concentración limitante de azúcar en los parámetros biológicos y físico-químicos de biopelículas duales de *S. sanguinis* y un aislado clínico oral de *C. albicans*?

HIPÓTESIS.

El exceso y concentración limitante de azúcar producen diferencias en los parámetros biológicos y físico-químicos de modelos de biopelículas duales de *S. sanguinis* y un aislado clínico oral de *C. albicans*.

OBJETIVOS.**OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el efecto del exceso y la concentración limitante de azúcar en los parámetros biológicos y físico-químicos de biopelículas duales de *S. sanguinis* y un aislado clínico oral de *C. albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Cuantificar parámetros biológicos de *S. sanguinis* y el aislado clínico oral de *C. albicans* en modelos de biopelículas duales, en concentraciones limitantes y de exceso de azúcar.

- Cuantificar parámetros físico-químicos de *S. sanguinis* y el aislado clínico oral de *C. albicans* en modelos de biopelículas duales, en concentraciones limitantes y de exceso de azúcar.

METODOLOGÍA.

Microorganismos y condiciones de crecimiento: Se utilizó un aislado clínico oral de la levadura *C. albicans* proveniente de saliva de niños preescolares libres de caries (ICDAS II código = 0) denominada P25-4 (especie confirmada por PCR y secuenciación obtenida de un proyecto FONDECYT previo de la Dra. Lozano, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la FOUCH) y la bacteria comensal *S. sanguinis* SK36 (donada por el Dr. Jens Kreth, Oregon Health and Science University, USA). Se utilizó el medio Yeast Nitrogen Base (YNB; BD) suplementado con glucosa o sacarosa según está descrito en el diseño experimental para el crecimiento y maduración de las biopelículas duales con los microorganismos mencionados, a 37°C en condiciones de microaerofilia con agitación suave durante el tiempo que corresponda. El proyecto FIOUCH bajo el cual se enmarca este Trabajo de Investigación, fue aprobado por el Comité de Ética de la FOUCH, acta N°05/2022 (Anexo 1).

Preparación de bloques de esmalte: Se realizó según lo descrito en Lozano y cols. (2019). Brevemente, los bloques de esmalte fueron obtenidos de coronas de incisivos de bovino, desinfectados previamente con una solución al 5% de NaOCl (hipoclorito de sodio) y conservados en una solución de Timol al 1% hasta su uso. La corona fue cortada con discos diamantados utilizando un micromotor (Ex-203, NSK, Japón) de forma longitudinal para luego realizar un nuevo corte de forma transversal. La dentina de estos bloques fue eliminada y los bloques fueron pulidos secuencialmente con discos sofex (Soflex, 3M-ESPE, St. Paul, MN, EE. UU.) de distinto grano, obteniendo finalmente bloques de esmalte con medidas aproximadas de 4 x 7 x 1 mm. Posteriormente, a cada uno de los bloques se le cuantificó la microdureza superficial inicial (SH); al realizar tres indentaciones lineales paralelas a través de un microindentador Knoop (402 MVD, Wolpert Wilson Instruments, Norwood, EE.UU.), a 50 g por 5 s. Para homogeneizar la variabilidad de los bloques, solo se incluyeron aquellos con microdureza superficial inicial de alrededor de 360

$\pm 30 \text{ kg/mm}^2$ (n=24). Posteriormente, los bloques fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min.

Diseño experimental: Modelo de biopelículas de dos especies (modelo dual):

Se utilizó el diseño experimental descrito en Lozano y cols. (2019) con algunas modificaciones. Brevemente, los bloques de esmalte se acondicionaron con saliva humana filtrada (filtros de $0,22 \mu\text{M}$; Merck Millipore) durante 30 min a 37°C para que se forme la película salival adquirida. (La saliva utilizada fue obtenida de dos sujetos sanos oralmente con ayunas de 10-12 h; Consentimiento Informado, Anexo 2). Posteriormente, los bloques de esmalte fueron posicionados y suspendidos de forma vertical mediante alambres de ortodoncia en una placa de cultivo celular de 24 pocillos que contenían 2 mL de medio YNB suplementado con una solución de sacarosa al 10% para permitir la adherencia de los microorganismos por 10 h a 37°C , luego de inocular con *S. sanguinis* y *C. albicans* al mismo tiempo. Adicionalmente, se agregó suero fetal bovino (SBF, Gibco, Nueva York, EE.UU.) al 10% para permitir el desarrollo de hifas en la levadura. Los pre-cultivos de la bacteria y levadura crecieron en medio YNB suplementado con glucosa 1% (5,5 mM) hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5 y 0,38, respectivamente. Después de las 10 h, las biopelículas maduraron en medio YNB suplementado con 0,1 mM (0,02%) de glucosa (concentración basal de glucosa en saliva) por 22 h a 37°C , en condiciones de microaerofilia. Durante los 5 días posteriores, los bloques de esmalte/biopelículas fueron expuestos por 5 min, 3 veces al día a una solución de sacarosa al 10% para emular una condición cariogénica (exceso de azúcar) o NaCl al 0,9% que corresponde al control negativo de caries (limitación de azúcar). Luego de las exposiciones diarias, los bloques de esmalte/biopelículas fueron lavados con NaCl 0,9% y devueltos a la placa de cultivo previa, la cual tenía medio YNB suplementado con 0,1 mM (0,02%) de glucosa. El medio de crecimiento fue reemplazado 2 veces por día, es decir, después de la primera exposición diaria y luego de la última exposición del día. Los ensayos de biopelículas duales fueron

realizados por sextuplicado en al menos dos experimentos independientes (n=12). Luego de transcurridos los 5 días de tratamiento se determinaron los siguientes parámetros:

Parámetros Biológicos:

Viabilidad Celular: Las biopelículas adheridas a los bloques de esmalte fueron transferidas y removidas a un tubo estéril con 1 mL de NaCl al 0,9%. Las biopelículas fueron dispersadas con un homogeneizador vórtex a máxima velocidad durante 1 a 2 min. La solución “madre” obtenida se diluyó seriadamente 1/10 v/v en NaCl 0,9% hasta $10^{-6} v/v$ y se sembró 100 μ L de las dos últimas diluciones por duplicado en medio Infusión Cerebro Corazón (BHI; BD) agar al 1,5% para el desarrollo de colonias de bacterias y por otro lado, una dilución hasta $10^{-4} v/v$ para sembrar 100 μ L de las dos últimas diluciones por duplicado en medio Sabouraud dextrosa (SD; Oxoid) agar al 1,5% para el desarrollo de colonias de levaduras. Las placas fueron incubadas aeróbicamente a 37°C por 48 h para el desarrollo de colonias de levaduras mientras que la cuantificación de las colonias bacterianas se realizó luego de incubar las placas en condiciones de microaerofilia a 37°C por 24 h. El recuento de colonias para cada microorganismo se expresó en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) (Lozano y cols., 2017).

Cuantificación de la formación de hifas: Se realizó como ha sido descrito previamente por do Rosário Palma y cols. (2019). Brevemente, 50 μ L de la solución “madre” fue dispuesta en un portaobjetos y observada en un microscopio óptico (Standard 20, Carl Zeiss, Alemania) a una magnificación de 40x. La cuantificación se realizó analizando diez campos microscópicos, por duplicado, tomados desde las soluciones “madre” desde ambas condiciones experimentales para obtener un promedio del número de hifas.

Microscopía electrónica de barrido (SEM): Para observar la capacidad de formar biopelículas duales de *S. sanguinis* y el aislado clínico oral de *C. albicans*, los bloques de esmalte con las biopelículas, desde ambas condiciones experimentales, se observaron mediante SEM. Las biopelículas fueron fijadas con glutaraldehído 0,1% y tratadas con alcoholes en concentraciones ascendentes para su visualización mediante SEM (JEOL JSM IT300LV; Tokio, Japón), servicio ubicado en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las imágenes obtenidas fueron analizadas de forma descriptiva.

Parámetros Físico-químicos:

Medición de pH en biopelículas duales: El pH fue determinado de acuerdo con Lozano y cols. (2019). Las mediciones fueron realizadas dos veces al día durante los 5 días de tratamiento; en la mañana (previo al primer pulso de sacarosa) y la segunda medición durante la noche (posterior al último pulso). Esta medición se realizó con un microelectrodo acoplado a un pH-metro Benchtop “all in on” (ION 700, OAKTON, Chicago, USA).

Desmineralización del bloque de esmalte: La desmineralización de los bloques de esmalte fue determinada a través del parámetro de Knoop’s descrita en Díaz-Garrido y cols. (2016). Brevemente, se determinó la microdureza superficial inicial $(SH)_i$ (una vez preparados los bloques de esmalte y antes de comenzar el experimento, lo cual fue mencionado previamente). Después del día 5 de la fase experimental, los bloques fueron montados en placas de vidrio y se realizaron nuevamente tres indentaciones lineales separadas a 100 μm cada una de ellas, adyacentes a las indentaciones iniciales. Éstas fueron consideradas como SH final $(SH)_f$. Los promedios de SH_i y SH_f fueron usados para calcular el porcentaje de pérdida de (micro)dureza superficial (%SHL), interpretada como desmineralización. La fórmula utilizada para calcular el %SHL es: $(\text{promedio } SH_i - \text{promedio } SH_f) \times 100 / SH_i$.

Producción de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂): Al final de los ensayos, se utilizó el sobrenadante filtrado del medio de cultivo de cada pocillo donde se encontraban los bloques/biopelículas suspendidos en ambas condiciones experimentales y el kit Amplex™ Red (ThermoFisher Scientific). Brevemente, en presencia de peroxidasa, el reactivo Amplex™ Red reacciona con H₂O₂ (liberado de las muestras biológicas) en una estequiometría 1:1 para crear un producto de oxidación rojo fluorescente, la resorufina. Posteriormente, se calculó la concentración de H₂O₂ en el sobrenadante siguiendo las instrucciones del proveedor. La cuantificación se realizó en tres réplicas biológicas por condición a partir de dos experimentos independientes.

Análisis estadístico: Los datos obtenidos para todas las variables se les aplicó el test Shapiro Wilk para la distribución de estos. Los resultados de los parámetros mencionados fueron analizados de la siguiente manera: el recuento de células viables de *S. sanguinis* y *C. albicans*, fueron analizadas utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon. La cuantificación de la filamentación de la levadura, determinación de pH, desmineralización de los bloques de esmalte dental y concentración de peróxido de hidrógeno se expresaron como promedios y desviación estándar, los cuales se analizaron con el test estadístico paramétrico T-test, para muestras independientes. Las observaciones y análisis de la estructura de las biopelículas individuales fueron realizadas de forma descriptiva. Para todos los análisis, se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue <0,05. Se usó el software Graphpad Prism 8.0.

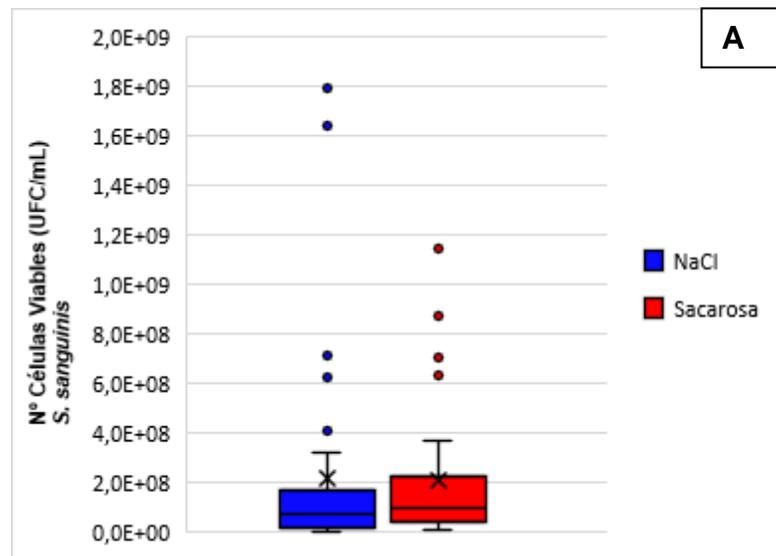
RESULTADOS.

Parámetros Biológicos:

Efecto de sacarosa en la viabilidad celular de *C. albicans* y *S. sanguinis* en modelo de biopelícula dual:

Como se muestra en la figura 1A, las medianas de viabilidad de la bacteria en condición control fue $7,1 \times 10^7$ UFC/mL, rango: $1,0 \times 10^6$ - $1,8 \times 10^9$, mientras que, en condición cariogénica fue $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, rango: $7,0 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^9$, lo que no representa una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

En la figura 1B, respecto a la viabilidad de la levadura, se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en las medianas entre la condición control ($1,1 \times 10^6$ UFC/mL, rango: $4,7 \times 10^5$ - $5,6 \times 10^6$) y la condición cariogénica ($1,6 \times 10^6$ UFC/mL, rango: $2,7 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^7$).



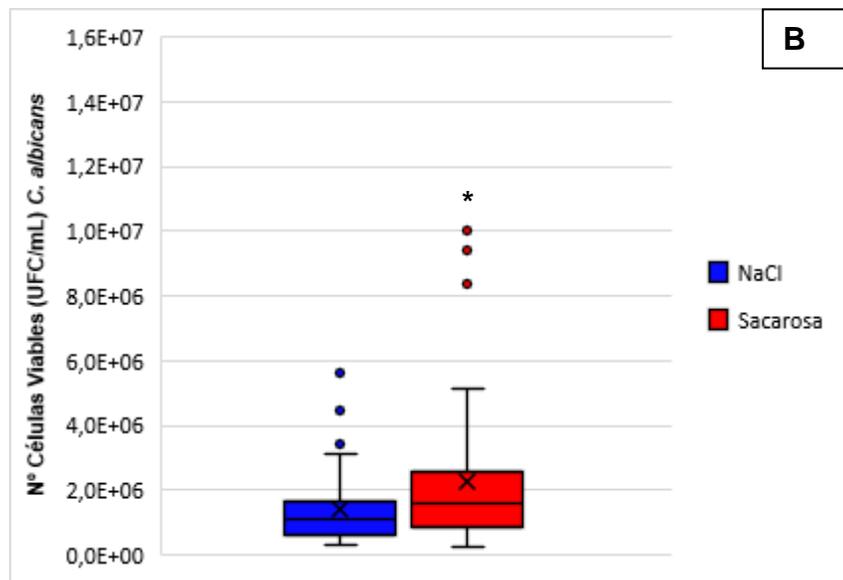


Figura 1: Efecto de sacarosa sobre la viabilidad celular de *S. sanguinis* y *C. albicans* en una biopelícula dual. **A)** Recuento celular de la bacteria y **B)** Recuento celular de la levadura, ambas en UFC/mL. Gráfico de cajas y bigotes en donde se representan las medianas en ambas condiciones experimentales y los puntos representan los datos atípicos. Test de Wilcoxon, para *S. sanguinis* ($p > 0,05$) y para *C. albicans* ($p < 0,05$).

Efecto de sacarosa sobre la formación de hifas de *C. albicans* en modelo de biopelícula dual:

En la figura 2, se comparan los promedios obtenidos de la formación de hifas de la levadura, tanto para la condición control ($7,1 \pm 2,3$) como la condición cariogénica ($14,3 \pm 5,3$), los cuales presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

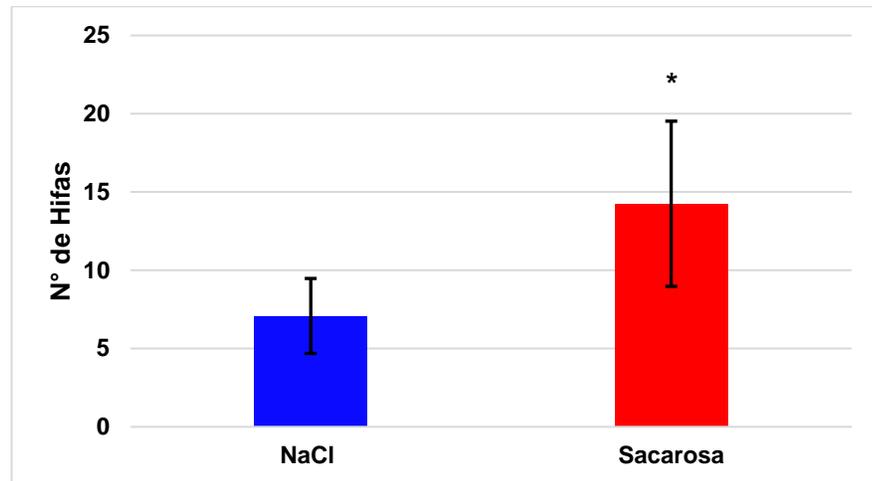


Figura 2: Efecto de sacarosa sobre la formación de hifas de *C. albicans* en modelo de biopelícula dual. Las barras representan los promedios y las barras de error las desviaciones estándar del número de hifas cuantificadas en ambas condiciones experimentales. T-test $p < 0,05$.

Parámetros Físico/Químicos:

Efecto de sacarosa sobre la acidogenicidad en modelo de biopelícula dual:

En la figura 3 se presenta la variación en los promedios de pH en la biopelícula dual durante todo el transcurso del experimento (142 h) en ambas condiciones experimentales. Se observa que, a partir de las 46 h hasta las 142 h, hay diferencias significativas en los valores de pH entre ambas condiciones experimentales ($p < 0,05$). El pH más bajo obtenido en la condición control fue $6,32 \pm 0,31$ a las 142 h, en cambio el pH más bajo obtenido en la condición de sacarosa fue $4,9 \pm 0,24$ a las 126 h.

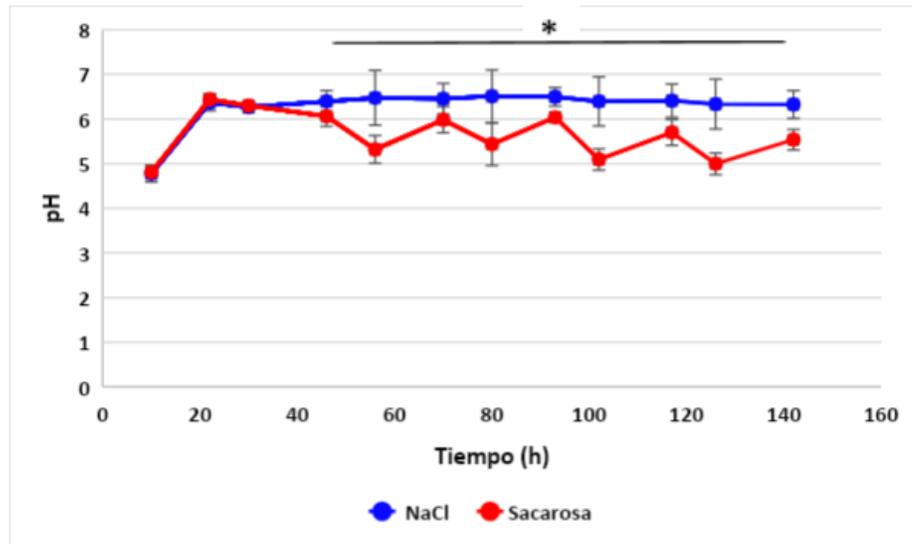


Figura 3: Efecto de la sacarosa sobre la acidogenicidad en modelo de biopelícula dual. La curva azul representa la condición control (NaCl 0,9%) y la curva roja la condición cariogénica (sacarosa 10%). Ambas curvas representan los valores promedios y las barras la desviación estándar en el transcurso del experimento. T-test, $p < 0,05$. El asterisco representa diferencia estadística significativa a partir de 46 h hasta las 142 h.

Efecto de la sacarosa sobre la desmineralización de los bloques de esmalte en un modelo de caries *in vitro* utilizando una biopelícula dual:

En la figura 4 se observa la diferencia en los promedios de la pérdida de microdureza superficial de los bloques de esmalte sometidos a condición control (NaCl) y cariogénica (sacarosa), lo cual se representa en porcentaje de desmineralización. Este valor fue de $53\% \pm 13,8$ en la condición control y de $66,1\% \pm 14$ en la condición cariogénica, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

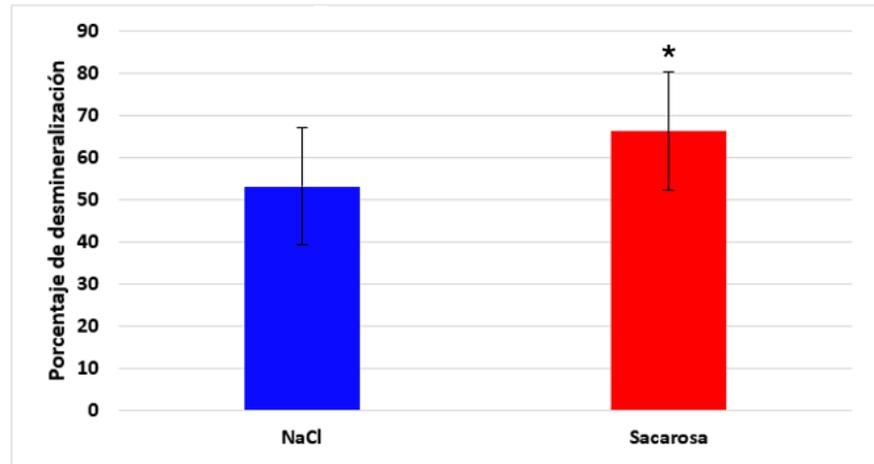


Figura 4: Efecto de la sacarosa sobre la desmineralización de los bloques de esmalte en un modelo de caries *in vitro* utilizando una biopelícula dual. Las barras representan los promedios del porcentaje de desmineralización y las barras de error las desviaciones estándar. T-test, $p < 0,05$.

Efecto de la sacarosa sobre la producción de H_2O_2 en un modelo de caries *in vitro* utilizando una biopelícula dual:

En la figura 5, se observan los promedios de la concentración de H_2O_2 (μM) entre la condición control y la condición cariogénica. Para la condición control fue de $2,51 \pm 0,77$ y para la condición cariogénica fue de $3,05 \pm 0,99$, lo que no representa una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

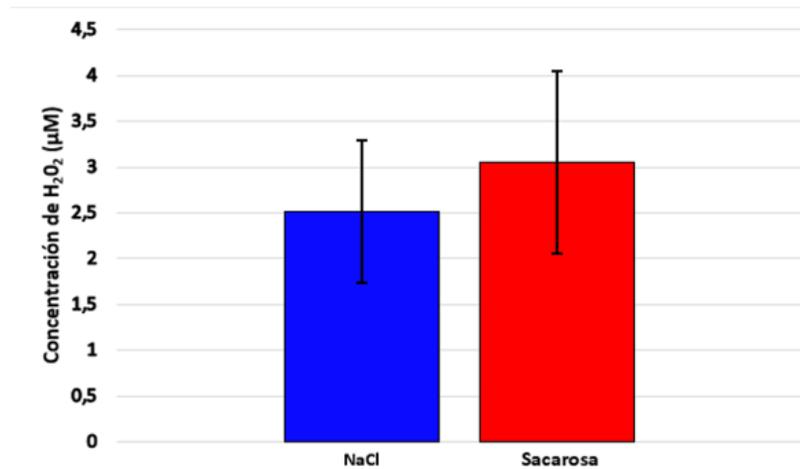


Figura 5: Efecto de la sacarosa sobre la producción de H₂O₂ en un modelo de caries *in vitro* utilizando una biopelícula dual. Las barras representan los promedios de concentración de H₂O₂ y las barras de error las desviaciones estándar. T-test, $p > 0,05$.

Microfotografías electrónicas de barrido de biopelículas duales de *C. albicans* y *S. sanguinis*:

En las figuras 6A y 6B, se observa la disposición de *C. albicans* con sus respectivas hifas sobre los bloques de esmalte, logrando apreciar una mayor cantidad de levaduras (formas ovales) y formas hifales en la condición cariogénica (6B), en comparación con la condición control (6A). Con este aumento no es posible apreciar las células bacterianas.

En las figuras 6C y 6D, se representa la diferencia descrita anteriormente en la cuantificación de la viabilidad celular y el número de hifas, tanto en condición cariogénica como control, pudiéndose observar un mayor número de estas dos variables en la condición sacarosa (6D). A esta magnificación se observan de mejor manera las dos variables mencionadas y las células bacterianas con un tamaño pequeño.

En las figuras 6E y 6F, se muestra la relación de proximidad (interacción física) existente entre *C. albicans* y *S. sanguinis* a mayor magnificación, tanto en la condición control como cariogénica, formando la estructura de biopelícula dual. No

se observa una diferencia importante en la cantidad de bacterias entre ambas condiciones.

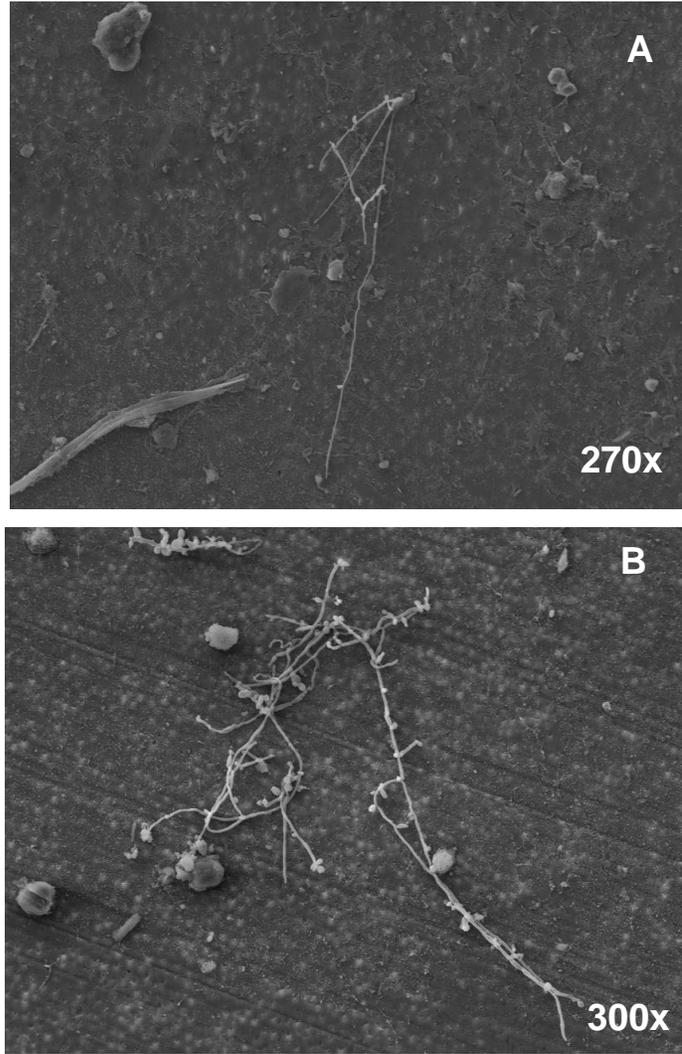


Figura 6: Continuación.

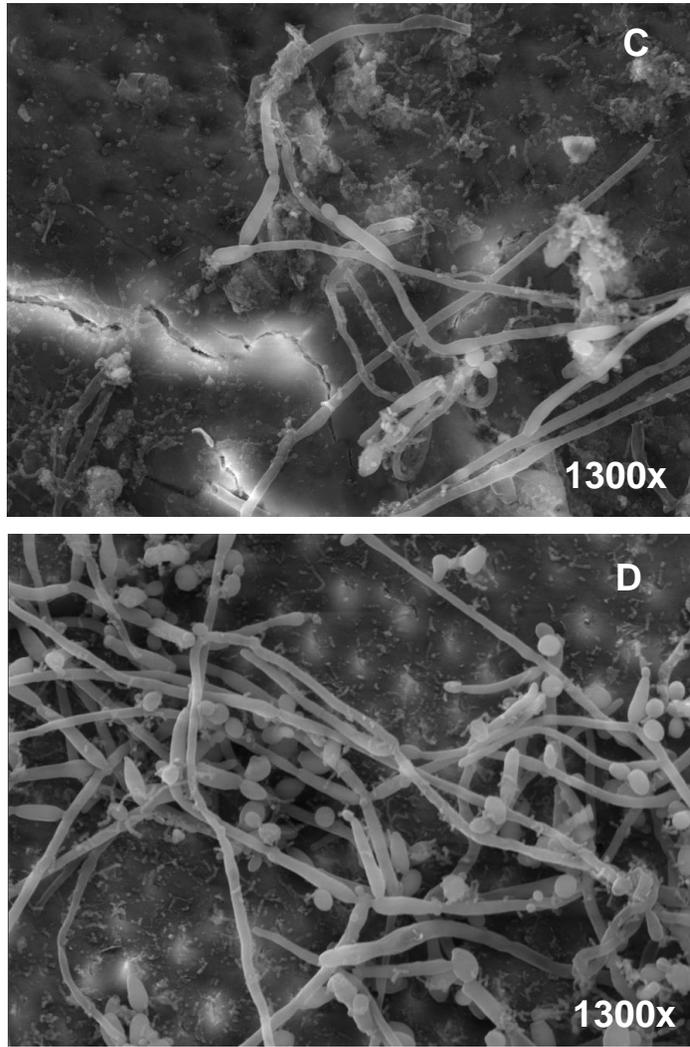


Figura 6: Continuación.

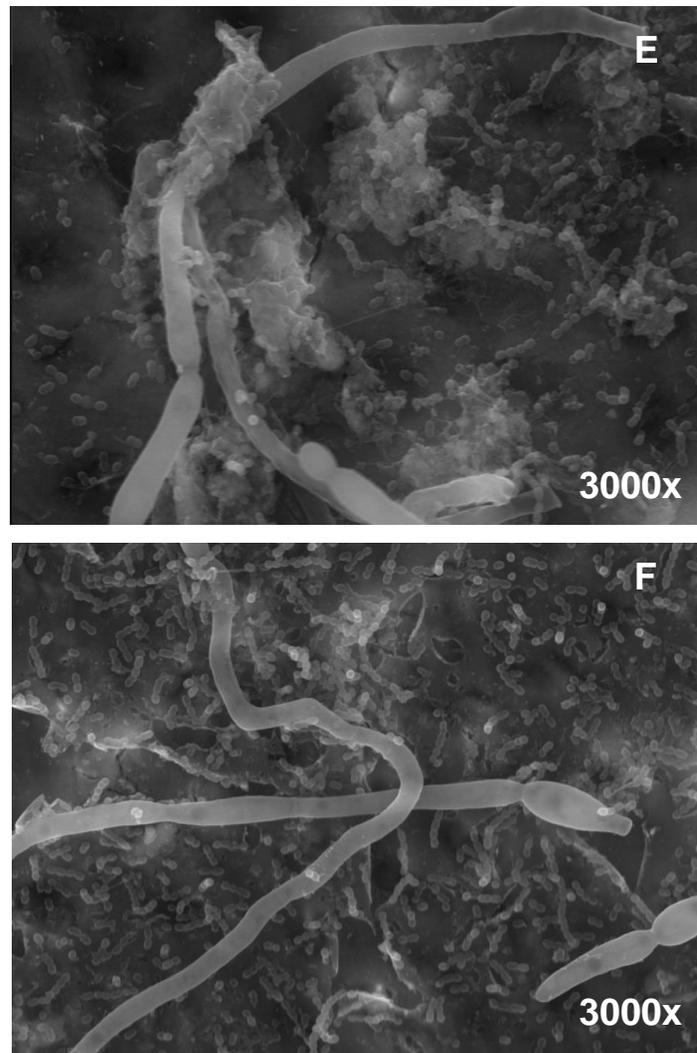


Figura 6: Microfotografías electrónicas de barrido de biopelículas duales de *C. albicans* y *S. sanguinis*. **A, C y E)** Condición control, magnificación 270x, 1300x y 3000x. **B, D y F)** Condición sacarosa, magnificación 300x, 1300x y 3000x.

DISCUSIÓN.

Efecto de sacarosa sobre la viabilidad celular de *C. albicans* y *S. sanguinis* en modelo de biopelícula dual.

La capacidad de metabolizar sacarosa y lactato favorece un aumento en la viabilidad celular de *C. albicans* en *biofilms* duales. Bezerra y cols. (2019), observaron que en *biofilms* monoespecie de *C. albicans* sometidos a mayores concentraciones de glucosa, presentaron una mayor producción de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles, favoreciendo la formación de *biofilms* y un aumento en la viabilidad celular.

En microambientes con alta concentración de azúcar y pH salival ácido se ha descrito un alto recuento de levaduras del género *Candida*. Ejemplo de lo anterior se encuentran los estudios realizados en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II, los cuales a través de análisis *in vitro* con aislados clínicos orales de *C. albicans*, provenientes de saliva de sujetos diabéticos expuestos a diferentes concentraciones de glucosa, se observó una mayor viabilidad celular respecto a aquellos provenientes de saliva de sujetos no diabéticos (Aitken-Saavedra y cols., 2018; Domingues y cols., 2022). También se ha observado altos recuentos de este género de levaduras en microambientes similares como lo es en saliva de sujetos con lesiones de caries severas o ICDAS II código 6 (Lozano y cols., 2017). En la revisión de Lok y cols. (2021), se describió que *C. albicans* tiene la capacidad de aumentar al doble su recuento viable solo en presencia de azúcares tales como glucosa, fructosa y galactosa. En el mismo estudio, en donde probaron el efecto de distintas fuentes de carbono y capacidad de formación de *biofilms* de esta levadura, observaron que bajo la exposición de sacarosa hubo mayor contenido de exopolisacáridos, rugosidad, altura y espesor de su *biofilms* en comparación a glucosa, arabinosa y lactato. En el artículo de Xiang y cols. (2023), se determinó que aislados clínicos orales de *C. albicans* presentaron alta actividad proteínica, propiedades acidogénicas, acidúricas y filamentación. Con respecto a esto último,

también se observó que entre estos aislados orales hubo variaciones significativas en el crecimiento de la hifa, es decir, hubo algunos defectuosos en la formación de éstas y otros fueron hiperfilamentosos.

Por otro lado, se observó que biopelículas mixtas de la levadura (aislado clínico oral o cepa de referencia) con *S. mutans* aumentó la biomasa y la acumulación de exopolisacáridos. En el estudio de Ev. y cols. (2020), mediante análisis RNA-seq, se estableció que aislados de *C. albicans* provenientes de lesiones de caries radiculares activas presentaron sobreexpresión de genes relacionados con actividad metabólica, transporte de azúcar, tolerancia al estrés, invasión y regulación de pH, respecto a aislados provenientes de superficies radiculares sanas, donde solo hubo sobreexpresión de genes relacionados a formación de biopelícula.

En el estudio de Huffines y cols. (2020), se observó que *biofilms* duales de *C. albicans* con *S. parasanguinis* eran menos robustos que aquellos de la levadura con *S. mutans*. En este mismo estudio, se determinó que no existen diferencias significativas en la biomasa de *S. parasanguinis* en cultivos simples, duales (con *C. albicans*) y de tres especies (*C. albicans* + *S. mutans*). Lo anterior podría explicar que en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en la viabilidad celular de *S. sanguinis* en presencia de la levadura.

Por último, en una revisión sistemática de Farías (2021) se determinó que el péptido que estimula la competencia proveniente de *S. gordonii* (microorganismo comensal asociado a dientes libres de caries), afecta negativamente la formación de biopelícula de *C. albicans* entre un 35% - 60%.

Según todos los antecedentes mencionados anteriormente y los resultados de este estudio, podemos decir que la presencia de exceso de azúcar en cultivos de *C. albicans*, fomenta la viabilidad de la levadura en biopelículas mono especie y en presencia de microorganismos cariogénicos y comensales (en biopelículas mixtas), tales como *S. mutans* y *S. sanguinis*, respectivamente.

Efecto de sacarosa sobre la formación de hifas de *C. albicans* en modelo de biopelícula dual.

Se ha determinado que, en presencia de azúcares como fructosa y glucosa, coexisten los tres tipos de morfología celular de *C. albicans*, las formas levaduriformes, pseudohifas e hifas, respecto a otros azúcares (revisado en Lok y cols., 2021).

En el estudio realizado por do Rosário Palma y cols. (2019), observaron en imágenes histológicas un aumento en la capacidad de filamentación de *C. albicans* cuando se cultivó con *S. mitis* y *S. sanguinis*. De la misma forma, las revisiones de Lohse y cols. (2018) y Koo y cols. (2018) señalan una interacción sinérgica entre la levadura y especies de *Streptococcus*, dentro de los que destaca *S. sanguinis*, favoreciendo la virulencia e invasión de tejidos por parte de la levadura.

En el estudio realizado por Morse y cols. (2019) observaron que la formación de hifas aumentó cuando *C. albicans* fue cultivada en conjunto a *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *A. viscosus* y *A. odontolyticus*. En tanto, cuando a este consorcio microbiano se le agregó *P. gingivalis*, esta capacidad de filamentación fue reducida. Con estos resultados podemos esbozar en parte que un rol de *C. albicans* dentro de estas sociedades microbianas es realizar una función estructural que permita la co-agregación bacteriana y la proliferación de la biopelícula.

Además, los pocos estudios existentes de interacciones entre los dos microorganismos utilizados en este estudio y nuestros resultados preliminares, especulan que *S. sanguinis* modularía los rasgos patogénicos de *C. albicans*.

Adicionalmente, en una tesis desarrollada en paralelo en nuestro laboratorio, se observó que la filamentación en biopelículas monoespecie de la levadura no presentó diferencias significativas (Orellana, 2023), aún con las mismas condiciones experimentales que nuestro estudio, donde la variable modificada fue la presencia de *S. sanguinis* en un modelo de biopelícula dual, por lo que podemos especular que la sola presencia de la bacteria y/o el H₂O₂ producido por ésta, estaría induciendo la formación de hifas. En el estudio de Xu y cols. (2017) demostraron

que la bacteria comensal *S. oralis* activa la vía de filamentación en *C. albicans* promoviendo la interacción entre reinos (procarionte - eucarionte) y por tanto, la formación de *biofilms*. Esto da cuenta, que el rasgo morfogenético de la levadura es promovido por la sola presencia de una bacteria.

Por otro lado, si bien es cierto, se ha descrito que un pH alcalino (pH sobre 6) induce la filamentación en la levadura (revisado en Basso y cols., 2019), en un estudio realizado por Merino y cols. (2011) se observó que esta transición morfológica también ocurre en un rango de pH desde 4,4 hasta 7,4 lo que estaría fomentando la formación de biopelículas.

En el estudio realizado por Ev. y cols. (2020), observaron una sobreexpresión de genes de *C. albicans* relacionados con el transporte de azúcares, la regulación de fuentes de carbono y la filamentación en muestras de biopelículas provenientes de lesiones de caries radiculares activas.

Estudios *in vitro* han descrito que el H₂O₂ (comercial) induce la transición morfológica de *C. albicans* desde la forma levaduriforme al estado de hifa (Westwater y cols., 2005; Komalapriya y cols., 2015). Sin embargo, se desconoce el efecto que podría tener en la filamentación el H₂O₂ producido biológicamente por *S. sanguinis*. Estudios preliminares en nuestro laboratorio mostraron que hubo un aumento significativo en la filamentación de esta levadura al exponerla a sobrenadante (filtrado) de cultivos de *S. sanguinis*, respecto a cuando se expuso a H₂O₂ comercial y a suero fetal bovino (datos no publicados).

Según todos los antecedentes mencionados anteriormente y los resultados de este estudio, podemos decir que la presencia de exceso de azúcar en cultivos de *C. albicans* fomenta la formación de hifas de la levadura en biopelículas duales con *S. sanguinis*.

Efecto de sacarosa sobre la acidogenicidad en modelo de biopelícula dual.

Willems y cols. (2016) determinaron que en *biofilms* duales de *C. albicans* con *S. mutans* el pH del medio fue mayor que el pH de *biofilms* mono especie de la bacteria, por lo que *C. albicans* estaría elevando el pH en microambientes acidogénicos, tal como también lo describieron Eidt y cols. (2019). A diferencia de los resultados obtenidos en Orellana (2023), en donde el pH en los *biofilms* mono especie de *C. albicans* expuestos a exceso de azúcar alcanzaron valores alrededor de 4,2, es decir, ácidos. Cabe destacar que estos estudios (excepto el de Orellana (2023)) no son comparables, debido a que las cepas de *C. albicans*, el medio de cultivo y el sustrato utilizado para formar las biopelículas son distintas. Sin embargo, en nuestros resultados los valores de pH en la condición con exceso de azúcar alcanzaron valores mínimos cercanos a 4,9, lo cual indica el efecto de *S. sanguinis* en la regulación del pH en ambientes levemente ácidos (inducción del sistema ADS). Si bien, *C. albicans* no puede producir ácido láctico porque no posee la enzima lactato deshidrogenasa, produce otros ácidos, como el ácido málico, pirúvico y acético, los cuales podrían contribuir al *pool* ácido predominante en una condición ácida, como la cariogénica (de Abreu y cols., 2016). Esto demuestra los rasgos acidogénicos y acidotolerantes de esta levadura (Revisado en Xiang y cols., 2023), lo anterior se confirmó en el estudio de Bezerra y cols. (2019), en donde la caída del pH presentó un efecto dosis dependiente con respecto a la concentración de glucosa en el medio de cultivo, en biopelículas mono especie de *C. albicans*. Por el contrario, biopelículas mono especie de *S. sanguinis* en condiciones experimentales similares a este trabajo, alcanzaron valores de pH próximos a 6,0 en condiciones de exceso de azúcar (Díaz-Garrido y cols., 2020).

Por lo tanto, según todos los antecedentes mencionados anteriormente y los resultados de este estudio, podemos decir que la presencia de exceso de azúcar en cultivos de *C. albicans*, induce una baja en el pH del medio en *biofilms* duales con *S. sanguinis*, solo que la presencia de la bacteria evita que estas caídas de pH sean tan pronunciadas.

Efecto de la sacarosa sobre la desmineralización de los bloques de esmalte en un modelo de caries *in vitro* utilizando una biopelícula dual.

Con todos los antecedentes mencionados anteriormente, Lok y cols. (2021) destacan que la asimilación de distintas fuentes de carbono dirige el metabolismo de *C. albicans*, teniendo un efecto sobre el crecimiento, pared celular, adhesión, formación de *biofilms*, formación de hifas y resistencia a drogas en esta levadura.

Uno de los rasgos de patogenicidad de *Candida* spp. es la producción y secreción de enzimas extracelulares, tales como, aspartil proteasas, fosfolipasas y lipasas, que se activan a pH bajos, degradan proteínas y componentes de matriz extracelular (Li y cols., 2014). También se ha descrito que *Candida* spp. es capaz de disolver dentina y consecuentemente liberar calcio al medio, pero lo anterior no se ha probado en esmalte dental, el cual tiene un mayor contenido mineral que la dentina (Szabó y cols., 2014). de Abreu y cols. (2016), observaron que biopelículas de *C. albicans* formadas sobre bloques de esmalte de bovino, cubiertos con un *pool* de saliva humana provenientes de niños preescolares con y sin caries, presentaron un alto porcentaje de desmineralización en ambas condiciones, comparado con el control, que en este caso eran bloques de esmalte cubiertos con saliva, pero sin la adición de la levadura. En el estudio de Charone y cols. (2017) utilizaron aislados clínicos orales de *Candida* spp. proveniente de placa supragingival de niños VIH positivos, y observaron una reducción gradual de la microdureza superficial de esmalte dental humano desde del día 1 al 5 luego de la formación de las biopelículas usando a estos como sustratos; se observó que *C. albicans* produjo liberación de calcio durante el desarrollo del experimento. En una tesis en paralelo por Orellana (2023), se observó que, con las mismas condiciones experimentales, pero sin presencia de *S. sanguinis*, es decir, en biopelículas monoespecies solo de la levadura, hubo una mayor desmineralización del esmalte en un medio con exceso de azúcar.

En el estudio de Willems y cols. (2016), se demuestra otra respuesta de la levadura en un medio con glucosa suplementado con 0,2% de sacarosa y formando

biopelícula con *S. mutans*. Los resultados de este estudio mostraron que hubo un pH más alcalino y consecuentemente menos liberación de calcio en *biofilms* duales con la bacteria con respecto a la biopelícula monoespecie de *S. mutans*. En estas condiciones experimentales, se podría especular que *C. albicans* podría tener un rol que disminuye la cariogenicidad en microambientes ricos en azúcar y en presencia de una bacteria acidogénica, sin embargo, es importante destacar que este estudio no utilizó bloques de esmalte para el crecimiento de los *biofilms*, sino discos de hidroxiapatita.

Con los datos mencionados y los resultados de nuestro estudio, podemos plantear que el exceso de azúcar en cultivos de *C. albicans* con *S. sanguinis* formando una biopelícula dual, aumenta la desmineralización del esmalte en un modelo de caries *in vitro*.

Efecto de sacarosa sobre la producción de H₂O₂ en modelo de biopelícula dual.

En nuestros resultados, se observó que la concentración de H₂O₂ no presentó diferencias significativas en las condiciones bajo estudio, aunque tendió a ser levemente mayor en la condición sacarosa (cariogénica). En el artículo de Díaz-Garrido y cols. (2016), se determinó que la producción de H₂O₂ fue alrededor de 15 μM en una biopelícula dual de *S. sanguinis* en presencia de *S. mutans*, utilizando el mismo modelo de caries *in vitro*. Se ha descrito en la literatura que existe una competencia entre estas dos bacterias (Kreth y cols., 2005; Kreth y cols., 2008; Lozano y cols., 2019), por lo que esta diferencia con respecto a nuestros resultados representa una respuesta antagónica a la disputa del mismo microambiente oral y por otro lado, a la naturaleza comensal de *S. sanguinis* que busca mantener la ecología oral y la atenuada funcionalidad de *S. mutans* como microorganismo patobionte. En cuanto a la interacción de *S. sanguinis* con *C. albicans* de tipo química o metabólica, hay escasa evidencia. En el estudio realizado por Zheng y cols. (2012) determinaron que la proteína A de Control de Catabolito de Carbono

(CcpA) regula la expresión del gen *spxB*, pero esta regulación no está influenciada por la concentración de glucosa. Esta relación podría explicar que no observamos diferencias significativas en la producción de H₂O₂ en la condición control v/s sacarosa. Cabe destacar que en biopelículas monoespecies de *C. albicans* la producción de H₂O₂ fue 0 (cero) en NaCl y concentraciones bajo 0,5 µM en sacarosa (datos no publicados).

Con los antecedentes revisados y los resultados de nuestro estudio, podemos decir que el exceso de azúcar en cultivos de *C. albicans* con *S. sanguinis* formando una biopelícula dual, no tiene un efecto sobre la producción de H₂O₂.

Rol de *Candida albicans* en la estructura de biopelículas orales.

El efecto de una dieta alta en azúcares en biopelículas multiespecies ha sido descrita en modelos que involucran *S. mutans* y *C. albicans*. Bowen y cols. (2018), indican que esta relación entre reinos se relaciona con la formación de EPS, la co-adhesión y el rol que cumplen las exoenzimas como Gtfs en la producción de una matriz celular que permita la interacción sinérgica entre estas especies. Una vez conformados estos *biofilms*, ambas especies son capaces de intercambiar metabolitos, tales como factores de crecimiento, mientras continúan produciendo exoenzimas y aumentando el volumen de matriz extracelular del *biofilms*. Así, se puede deducir que ambos microorganismos, con lo mencionado anteriormente, cumplen un rol estructural dentro de la biopelícula.

En condiciones de salud oral, *C. albicans* puede relacionarse de forma sinérgica con *S. sanguinis* (de forma química o metabólica), así, la formación de hifas sirve como superficie para la adhesión de estas bacterias y producir el establecimiento del *biofilms* (Ren y cols., 2022). En relación a nuestros resultados, se observó que un exceso de azúcar disponible significó que el número de levaduras e hifas se elevara (como se ha descrito anteriormente en otros estudios), pero no hubo un aumento significativo en el recuento de *S. sanguinis*. Las microfotografías electrónicas de barrido no dan cuenta del volumen y biomasa de la biopelícula, por

lo que utilizando microscopía invertida o CLSM (microscopía de barrido de láser confocal, por sus siglas en inglés), nos entregaría este tipo de información.

Si bien, el sinergismo entre *S. mutans* y *C. albicans* ha sido descrito, escasa es la evidencia en relación a streptococci comensales orales y su interacción con *C. albicans*. Ejemplo de lo anterior, en el estudio realizado por Huffines y cols. (2020), quienes observaron en estudios multiespecies que *S. parasanguinis* (bacteria comensal asociado a condición de salud oral) inhibe la adherencia de *C. albicans* y formación de glucanos de *S. mutans* al bloquear la actividad de sus enzimas Gtfs, lo que indicaría la potencial capacidad de *S. parasanguinis* en prevenir disbiosis orales.

CONCLUSIÓN.

El exceso de azúcar favorece el potencial patobionte de *C. albicans* aumentando su viabilidad celular, su filamentación y su capacidad desmineralizante.

En condiciones cariogénicas, la presencia de *S. sanguinis* en biopelículas duales con un aislado clínico oral de *C. albicans* actúa atenuando las caídas abruptas del pH del medio, disminuyendo el potencial desmineralizante de la levadura.

El exceso de azúcar disponible no tiene efecto en la viabilidad celular de *S. sanguinis* ni en la producción de H₂O₂.

Con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se sientan las bases para proponer o realizar estudios bioquímicos y moleculares para determinar la interacción entre *C. albicans* y otras bacterias comensales, tales como *S. sanguinis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aitken-Saavedra, J., Lund, R., González, J. & Huenchunao, R. (2018). Diversity, frequency and antifungal resistance of *Candida* species in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76(8), 580–586.

Basso, V., d'Enfert, C., Znaidi, S., & Bachellier-Bassi, S. (2019). From Genes to Networks: The Regulatory Circuitry Controlling *Candida albicans* Morphogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 422, 61–99.

Bezerra, N., Brito, A., de Medeiros, M. & de França Leite, K. (2019). Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of *Candida* single- and dual-species biofilms. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 10(3), e12412.

Biswas, S., Van Dijck, P., & Datta, A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 348–376.

Bowen, W., Burne, R., Wu, H., & Koo, H. (2018). Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends in Microbiology*, 26(3), 229–242.

Charone, S., Portela, M., Martins, K. & Soares, R. (2017). Role of *Candida* species from HIV infected children in enamel caries lesions: an in vitro study. *Journal of Applied Oral Science*, 25(1), 53–60.

Chen, H., Zhou, X., Ren, B., & Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1), 337–348.

de Abreu, T., Portela, M., Lima, P. & Castro, G. (2016). Demineralizing potential of dental biofilm added with *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* isolated from preschool children with and without caries. *Microbial Pathogenesis*, 100, 51–55.

d'Enfert, C., Kaune, A., Alaban, L. & Chakraborty, S. (2021). The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(3), fuaa060.

Díaz-Garrido, N., Lozano, C., & Giacaman, R. (2016). Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *European Journal of Dentistry*, 10(3), 345–350.

Díaz-Garrido, N., Lozano, CP., Kreth, J., Giacaman, RA. (2020). Competition and caries on enamel of a dual-species biofilm model with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21), e01262-20.

do Rosário Palma, A., Domingues, N., de Barros, P. & Brito, G. (2019). Influence of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguinis* on virulence of *Candida albicans*: in vitro and in vivo studies. *Folia Microbiologica*, 64(2), 215–222.

Domingues, P., Oliveira, V., Bim, F. & Aires, C. (2022). Influence of glucose supplementation on biofilm formation of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolated from diabetic and non-diabetic individuals. *Archives of Oral Biology*, 134, 105339.

Eidt, G., Andrade, C., Negrini, T., & Arthur, R. (2019). Role of *Candida albicans* on enamel demineralization and on acidogenic potential of *Streptococcus mutans* in vitro biofilms. *Journal of Applied Oral Science*, 27, e20180593.

Ev, L., Damé-Teixeira, N., Do, T., Maltz, M., & Parolo, C. (2020). The role of *Candida albicans* in root caries biofilms: an RNA-seq analysis. *Journal of Applied Oral Science*, 28, e20190578.

Falsetta, M., Klein, M., Colonne, P. & Scott-Anne, K. (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infection and Immunity*, 82(5), 1968–1981.

Farías, R. (2021). Efecto de la señalización por moléculas de quorum sensing de origen bacteriano sobre la expresión de factores de virulencia de *Candida albicans*. Tesis para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología. Universidad de Chile.

Fejerskov, O. (1997). Concepts of dental caries and their consequences for understanding. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 25, 5-12.

Giacaman, R., Fernández, C., Muñoz-Sandoval, C. & León, S. (2022). Understanding dental caries as a non-communicable and behavioral disease: Management implications. *Frontiers in Oral Health*, 3, 764479.

Hornby, J., Jensen, E., Lisec, A. & Tasto, J. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2982–2992.

Huffines, J., & Scoffield, J. (2020). Disruption of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergy by a commensal streptococcus. *Scientific Reports*, 10(1), 19661.

Kolenbrander P. (2011). Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *International Journal of Oral Science*, 3(2), 49–54.

Komalapriya, C., Kaloriti, D., Tillmann, A. & Yin, Z. (2015). Integrative Model of Oxidative Stress Adaptation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *PLoS One*, 10(9), e0137750.

Koo, H., Xiao, J., & Klein, M. (2009). Extracellular polysaccharides matrix--an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *International Journal of Oral Science*, 1(4), 229–234.

Koo H., Andes D. & Krysan D. (2018) *Candida*-streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathogens*, 14(12).

Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., & Qi, F. (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7193–7203.

Kreth, J., Zhang, Y., & Herzberg, M. (2008). Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4632–4640.

Kreth, J., Giacaman, R. A., Raghavan, R., & Merritt, J. (2017). The road less traveled - defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. *Molecular Oral Microbiology*, 32(3), 181–196.

Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(12), 745–759.

Leito, J., Ligtenberg, A., Nazmi, K., & Veerman, E. (2009). Identification of salivary components that induce transition of hyphae to yeast in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 9(7), 1102–1110.

Li, W., Yu, D., Gao, S. & Lin, J.(2014). Role of *Candida albicans*-secreted aspartyl proteinases (Saps) in severe early childhood caries. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6): 10766-10779.

Loesche W. (1976). Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sciences Reviews*, 9, 65–107.

Lohse, M., Gulati, M., Johnson, A., & Nobile, C. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(1), 19–31.

Lok, B., Adam, M., Kamal, L. & Chukwudi, N. (2021). The assimilation of different carbon sources in *Candida albicans*: Fitness and pathogenicity. *Medical Mycology*, 59(2), 115–125.

Lozano, C., Rodríguez, G., Lefimil Puente, C., Morales Bozo, I., & Urzúa Orellana, B. (2017). Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. *Acta Odontologica Scandinavica*, 75(1), 30–35.

Lozano, C., Díaz-Garrido, N., Kreth, J., & Giacaman, R. (2019). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* Expression of Competition-Related Genes, Under Sucrose. *Caries Research*, 53(2), 194–203.

Marsh, P., & Zaura, E. (2017). Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44 Suppl 18, S12–S22.

Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. & Dige, I. (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.

Merino, G., Cedillo, L., Silva, F. & Muñoz A. (2011). Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica. *Revista Mexicana de Micología*, 33, 1-8.

MINSAL (2018). Encuesta Nacional de Salud 2016-2017. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud.

Morse, D., Wilson, M., Wei, X. & Bradshaw, D. (2019). Modulation of *Candida albicans* virulence in in vitro biofilms by oral bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 68(4), 337–343.

Niskanen, M., Mattila, P., Niinimaa, A. & Vehkalahti, M. (2020). Behavioural and socioeconomic factors associated with the simultaneous occurrence of periodontal disease and dental caries. *Acta Odontológica Scandinavica*, 78(3), 196-202.

Orellana C. (2023). Formación de biopelículas de un aislado clínico oral de *Candida albicans* en condiciones limitantes y con exceso de azúcar. Tesis para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología. Universidad de Chile.

Palmer R. (2014). Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontology 2000*, 64(1), 20–39.

Pitts, N., Zero, D., Marsh, P. & Ekstrand, K. (2017). Dental caries. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3,17030.

Pyati, S., Naveen Kumar, R., Kumar, V. & Praveen Kumar, N. (2018). Salivary Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Total Protein, Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Children with and without Dental Caries. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 42(6), 445-449.

Pereira, D., Seneviratne, C., Koga-Ito, C., & Samaranayake, L. (2018). Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen?. *Oral Diseases*, 24(4), 518–526.

Philip, N., Suneja, B., & Walsh, L. (2018). Beyond *Streptococcus mutans*: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *British Dental Journal*, 224(4), 219–225.

Ren, Z., Jeckel, H., Simon-Soro, A. & Xiang, Z. (2022). Interkingdom assemblages in human saliva display group-level surface mobility and disease-promoting emergent functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(41), e2209699119.

Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. & Cury, J. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44 Suppl 18, S5–S11.

Sebaa, S., Boucherit-Otmani, Z., & Courtois, P. (2019). Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. *Molecular Medicine Reports*, 19(4), 3201–3209.

Simón-Soro, A., Guillen-Navarro, M., & Mira, A. (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 6, 25443.

Sudbery P. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(10), 737–748.

Szabó, B., Majoros, L., papp-Falusi, E. & Szabó, Z. (2014). Studies on the possible aetiological role of different *Candida* species in pathogenesis of dentine caries by monitoring the calcium release from tooth particles. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 61(1), 11-17.

Vila, T., Kong, E., Ibrahim, A. & Piepenbrink, K. (2019). *Candida albicans* quorum-sensing molecule farnesol modulates staphyloxanthin production and activates the thiol-based oxidative-stress response in *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 10(1), 625–642.

Westwater, C., Balish, E., & Schofield, D. A. (2005). *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryotic cell*, 4(10), 1654–1661.

Willems, H., Kos, K., Jabra-Rizk, M., & Krom, B. (2016). *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathogens and disease*, 74(5), ftw039.

Xiang, Z., Wakade, R., Ribeiro, A. & Hu, W. (2023). Human Tooth as a Fungal Niche: *Candida albicans* Traits in Dental Plaque Isolates. *American Society for Micrology*, 14(1), e0276922.

Xu, H., Sobue, T., Bertolini, M. & Thompson, A. (2017). *S. oralis* activates the Efg1 filamentation pathway in *C. albicans* to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms. *Virulence*, 8(8), 1602–1617.

Yoshida, Y., Konno, H., Nagano, K. & Abiko, Y. (2014). The influence of a glucosyltransferase, encoded by *gtfP*, on biofilm formation by *Streptococcus sanguinis* in a dual-species model. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 122(10): 951-960.

Zheng, L., Chen, Z., Itzek, A., Herzberg, M., & Kreth, J. (2012). CcpA regulates biofilm formation and competence in *Streptococcus gordonii*. *Molecular Oral Microbiology*, 27(2), 83–94.

ANEXOS

ANEXO 1: ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE APROBACIÓN

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°05/2022

PROTOCOLO DE ESTUDIO N°05/2022

Con fecha 10 de enero de 2023 el Comité de Ético Científico (CEC) de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dra. Eugenia Henríquez D'Aquino – Miembro Permanente – Presidenta.
 Dr. José Suazo Sanhueza – Miembro Permanente – Vicepresidente.
 Dr. Juan Estay Larenas – Miembro Permanente - Secretario Ejecutivo.
 Dr. Ignacio Araya Cabello – Miembro Permanente
 Dra. Claudia Contreras Reyes – Miembro Permanente
 Sra. Nailah Shakhtur Said – Miembro Permanente
 Dr. Cristian Bersezio Miranda – Miembro Permanente
 Dra. Blanca Urzúa Orellana – Miembro Permanente.
 Dra. Valentina Fajreldin Chuaqui - Miembro Permanente

Ha revisado el Proyecto de Investigación: Proyecto FIOUCH titulado: "CANDIDA ALBICANS Y STREPTOCOCCUS SANGUINIS: ¿COMPETENCIA O SINERGISMO EN EL BIOFILMS DENTAL? cuyo Investigador responsable es la Dra. **Carla Lozano Moraga**, Bióloga, Doctora en Ciencias Mención Microbiología, Profesora Asociada del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD), de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto de investigación FIOUCH, versión 24/10/2022.
- Currículum Vitae de la Investigadora y de los co- investigadores
- Formulario de Consentimiento Informado
- Carta Compromiso de la investigadora principal y de los co-investigadores
- Otros documentos: Manual del investigador completado por Dra. Carla Lozano, Declaración simple de no evaluación por otro comité de ética, Lista de chequeo para entregar documentos al CEC, Certificados de título de todos lo(a)s investigadore(a)s, Currículo vitae de todo(a)s los investigadore(a)s.

A la luz de los antecedentes presentados, el CEC considera que:

1. El Estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los participantes involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores.
 (La investigadora responsable ha dado respuesta satisfactoria a los alcances solicitados por este Comité).
2. Los Consentimientos Informados son adecuados en forma y fondo.

En virtud de las consideraciones anteriores y, en consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, resuelve dar la categoría de **APROBADO** al proyecto presentado.

Esta aprobación se extiende por un plazo de **24 meses**, a contar de esta fecha.

Lugar de realización del estudio: Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Requiere seguimiento o visita en terreno: Si ____ No N° de vistas: ____

El investigador responsable deberá tener presente que debe:

- Enviar para aprobación o toma de conocimiento de nueva documentación relacionada al estudio.
- Informar cambio en los delegados del director de la institución.
- **Enviar un informe anual de los avances del Proyecto.**
- Solicitar extensión de plazo de aprobación (si aplica).
- Enviar informe final del Proyecto.

Los ítems mínimos que deben contener los informes anuales y el informe final son los siguientes:

1. Cumplimiento de los objetivos.
2. Número de participantes enrolados.
3. Número y motivo de los sujetos que abandonan o se retiran de la investigación.
4. Listado de desviaciones al proyecto.



Dra. Eugenia Henríquez D'Aquino
Presidenta CEC

C/C Secretaría CEC

ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO.

inicio de este estudio.

- Presenta sus encías sanas.
- No presenta caries activas o presenta historia de caries.
- No presenta alguna enfermedad sistémica descompensada o sin tratamiento.

Participación voluntaria

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted decide si desea participar o no.

Procedimientos

Si usted acepta participar, será examinado/a intraoralmente por la Dra. Ximena Lee, Cirujana-Dentista, utilizando guantes, mascarilla, espejo dental y una luz artificial. El día de la toma de muestra de saliva el/la voluntario/a debe haberse lavado los dientes al menos 2 horas antes y no haber fumado ni consumido alimentos o líquidos. Se le tomará una muestra de saliva, la cual deberá ser depositada dentro de un frasquito que nosotros le proporcionaremos. En el caso que usted esté dispuesto a participar, pero no es capaz de depositar la saliva en el frasquito, nosotros lo podemos ayudar. Para la toma de muestra de saliva, usted deberá permanecer sentado y tranquilo durante el tiempo necesario expectorando saliva en el frasquito. Luego de su uso, la saliva será eliminada como residuo biológico.

Antes de esta actividad se le dará una breve explicación del procedimiento a realizar por parte de la Dra. Lee.

Este estudio está planificado para que tenga una duración de 24 meses a contar de la fecha de aprobación del Comité Ético Científico y del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Odontología, U. de Chile.

Resultados de la investigación

Los resultados a obtener de esta investigación serán publicados en revistas científicas, los cuales ayudarán a la comprensión de las enfermedades en la cavidad bucal.

Riesgos, molestias y/o eventos adversos

Durante el examen intraoral o posterior a su participación no existe riesgo alguno para su salud.

Beneficios

Tendrá el beneficio de conocer el estado actual de su boca, el cual conocerá una vez se le haya realizado el examen intraoral. No habrá un beneficio económico para usted. Si usted desea conocer los resultados de la investigación, con gusto el equipo de investigadores se los puede exponer de manera didáctica para su total comprensión.

Confidencialidad

Nosotros no compartiremos información acerca de usted con nadie fuera del equipo investigador. La información personal que obtengamos de este proyecto se mantendrá en privado. Cualquier información acerca de usted llevará un número o código en lugar de su nombre.

Ética

Esta investigación ha sido aprobada para su realización por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.



Información o dudas

Ante cualquier consulta o duda acerca de la investigación existirá un/a investigador/a informado para ayudarlo e informarlo al respecto. Usted deberá comunicarse con la Dra. Ximena Lee al número 2297886005 o a la Dra. Carla Lozano al número 229781792. En caso de duda sobre sus derechos comunicarse con la Presidenta del Comité Ético Científico. Dra. Eugenia Henríquez D'., Teléfono: 229781845, Email: cec.fouch@odontologia.uchile.cl Ubicado en el 3° Piso, Olivos 943, Comuna de Independencia.

II. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

Leí la información precedente, o me la leyeron. He tenido la oportunidad de hacer preguntas acerca de ella, y todas las preguntas que hice fueron respondidas a mi entera satisfacción. Consiento voluntariamente participar en este estudio y entiendo que tengo el derecho a retirarme en cualquier momento. Se me ha entregado una copia de este documento.

Nombre completo sujeto voluntario/a

Teléfono: _____

Firma sujeto voluntario/a: _____

Fecha: _____

Al/a sujeto voluntario/a he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto es sujeto voluntario/a. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna. He sido testigo que el sujeto firmó el documento.

Nombre completo investigador/a:

Firma Investigador/a: _____

Fecha: _____

Nombre completo Director/a Institución:

Firma: _____

Fecha: _____

