



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

**INTERACCIÓN DE *Streptococcus sanguinis* EN LA VIABILIDAD Y
CRECIMIENTO DE *Candida albicans* EN LA CAVIDAD ORAL**

Felipe Hernández Hernández

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Carla Lozano M.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Claudia Lefimil P.

**Adscrito a Proyecto de investigación: PRI-ODO 2016 04/016
Santiago - Chile
2016**



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

**INTERACCIÓN DE *Streptococcus sanguinis* EN LA VIABILIDAD Y
CRECIMIENTO DE *Cándida albicans* EN LA CAVIDAD ORAL**

Felipe Hernández Hernández

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Carla Lozano M.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Claudia Lefimil P.

**Adscrito a Proyecto de investigación: PRI-ODO 2016 04/016
Santiago - Chile
2016**

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a la facultad de Odontología de la Universidad de Chile por acogerme y hacerme vivir uno de los períodos más importantes de mi vida. Sin duda que este largo camino no estuvo exento de momentos de estrés, de largas noches de estudio y adversidades, pero también estuvo lleno de momentos imborrables que me hicieron crecer como persona y futuro profesional. Muchas gracias por permitirme cumplir el sueño, que desde enseñanza media era ser “dentista”, para ayudar a la población chilena desde este importante ámbito que es la salud.

Agradezco al PRI-ODO 2016 04/016 que otorgó los recursos para el desarrollo de este proyecto de investigación, que espero de todo corazón pueda ser un pequeño aporte a la investigación en ciencias odontológicas.

Agradezco también a los docentes que conformaron mi comisión evaluadora, Dra. Eugenia Henríquez, Dra. Patricia Palma y Dr. Alejandro Escobar, además del Dr. Cristián Vergara, por sus aportes y sugerencias a este trabajo de investigación que fueron de vital importancia para el perfeccionamiento del mismo.

Quiero agradecer profundamente a Andrea, Katy, Dr. Célis, a mi co-tutora Prof. Dra. Claudia Lefimil y en general a todo el gran equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, por su gran disposición a ayudarme, siempre con una sonrisa en la cara, en todo lo que necesité. Quiero agradecer en especial a mi tutora, la Prof. Dra. Carla Lozano, por su infinita paciencia, por permitirme la grata experiencia de ser su ayudante durante 4 años, y enseñarme casi la totalidad de lo que sé en lo que respecta a investigación en odontología. Espero haber sido un aporte en todo su excelente trabajo y le deseo sinceramente mucho éxito personal, familiar y profesional para el futuro.

Agradecer al Preuniversitario solidario Germán Valenzuela Basterrica, por permitirme aportar un granito de arena en mejorar la educación de tantos adolescentes con potencial que por problemas económicos no lograr realizar sus

sueños. También por la instancia de descubrir que la docencia me llena profundamente como persona. Sin duda que este preuniversitario influirá en las decisiones que pueda tomar en el futuro.

A mis amigos de infancia, por tantas anécdotas y momentos de risa, por ayudarme a salir del mundo de la odontología para hablar de otros aspectos de la vida, que no tienen que ver con dientes, coronas o prótesis, pero que nunca hay que dejar de lado. Gracias a ellos por hacerme olvidar a ratos las pruebas, controles y exámenes que tendría semana a semana. Les deseo a todos mucho éxito, y espero que las circunstancias de la vida no nos impidan seguir viéndonos, por lo menos de vez en cuando, en el futuro. A mis amigos de la facultad, por compartir conmigo los sufrimientos y los nervios previos a las evaluaciones, sin duda que todo se aliviaba al saber que no era el único que sentía inseguridades, aprensiones y dificultades, sobre todo en las etapas clínicas. Pero también quiero agradecer por los momentos fuera de clases, en donde se forjaron momentos memorables y relaciones muy enriquecedoras, que espero también perduren en el tiempo.

A toda mi hermosa familia santiaguina, curicana y buinense, en especial a Tía Pao, Seba, Yerko, Tebo, Elisa, Sylvana, por todo el amor que me han entregado y por tantos momentos lindos vividos, por estar siempre preocupados de mi rendimiento universitario, por darme ánimo ayudarme siempre en todo lo que necesité. A mis abuelos Eva Matas y Gerardo Hernández, que siempre han sido indispensables para mí. Gracias por ser mis segundos padres, por todo el tiempo de su vida dedicado en mi crianza, en cuidarme, quererme y educarme, desde que nací hasta la actualidad.

A Scarlettte, por su apoyo incondicional día a día, por alentarme siempre e instarme a seguir creciendo como profesional, y en especial por el amor que siempre me entrega, que ha sido uno de los pilares fundamentales en estos últimos años de carrera. Agradecer también a su familia, por el cariño que me han entregado y por transformarse rápidamente en mi segunda familia.

Finalmente agradecer a los más importantes en todo este proceso, a Juan y Rosa María, mis padres. Gracias a ellos por todo el amor y la confianza que depositaron siempre en mí. Por dejarme soñar y hacerme creer que los sueños sí pueden cumplirse. Por esforzarse día a día para que nunca me faltara nada. Sin duda que este logro se debe principalmente a ellos, y espero de todo corazón poder retribuirles de ahora en adelante, aunque sea una pequeña parte de todo lo que han hecho por mí. Les deseo lo mejor para el futuro, que descansen y realicen todo lo que tengan en mente y que, aunque nunca dejarán de cumplir el rol de padres, encuentren en mí ahora un apoyo y un compañero de vida.

ÍNDICE:

| | Página |
|-------------------------------------|--------|
| Agradecimientos | 4 |
| Índice | 7 |
| Resumen | 8 |
| Marco teórico | 10 |
| Introducción | 10 |
| Caries dental | 10 |
| Microbiología en la cavidad oral | 11 |
| Biopelículas en la cavidad oral | 12 |
| Levaduras del género <i>Candida</i> | 15 |
| Microbiología de la caries dental | 19 |
| Hipótesis | 23 |
| Objetivos | 23 |
| Material y métodos | 24 |
| Resultados | 27 |
| Discusión | 34 |
| Conclusiones | 43 |
| Referencias bibliográficas | 44 |

RESUMEN:

Introducción: *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) es un colonizador primario de la biopelícula dental asociada a salud. Esta bacteria produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un sub-producto del crecimiento y que es bacteriostático para otros streptococci orales, como *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), quien, bajo condiciones determinadas de pH y disponibilidad de carbohidratos fermentables, se relaciona con el inicio y progresión de la caries dental. En este contexto, actualmente se propone una relación sinérgica entre *S. mutans* y *Candida albicans* (*C. albicans*), levadura comensal de la cavidad oral capaz de causar diversas patologías en humanos.

El efecto de *S. sanguinis*, mediante la producción de H_2O_2 , en *C. albicans* no ha sido completamente estudiado.

Según lo mencionado anteriormente, el objetivo de este estudio es determinar preliminarmente si existe modulación del crecimiento de *C. albicans*, en co-cultivo con *S. sanguinis*.

Material y Métodos: Se utilizó *S. sanguinis* SK36, *S. mutans* ATCC 25175, *C. albicans* ATCC 90029 y un aislado clínico de *C. albicans* (P1-1) (proveniente de un niño con caries activas). Se realizaron ensayos de competencia en medio líquido y sólido de *S. sanguinis* o *S. mutans* con *C. albicans* (cepa de referencia o aislado clínico), se determinó pH y células viables para cada pareja en co-cultivo líquido. Inhibición del crecimiento en medio sólido fue evaluada según presencia de halo inhibitorio próximo a alguno de los microorganismos. Ensayos fueron incubados en microaerofilia a 37 °C durante 48 h con agitación. Además, se realizó un test de concentración inhibitoria mínima (CIM) de H_2O_2 para ambas cepas de *C. albicans* y también se determinó la cantidad de H_2O_2 producida por *S. sanguinis*, de acuerdo a una curva estándar previamente diseñada. Los datos fueron analizados de manera descriptiva, comparando medianas entre distintos grupos y dentro de un mismo grupo.

Resultados: En medio sólido, *C. albicans* produjo halo inhibitorio sobre *S.*

sanguinis. En medio líquido, *S. sanguinis* y *C. albicans* (ATCC y P1-1) aumentaron su crecimiento en co-cultivo, respecto de su crecimiento aislado. Además, generaron siempre una alcalinización del medio, respecto al pH inicial. A 0,1 mM de H₂O₂, la sobrevivencia de ambas cepas de *C. albicans* se redujo en un 70%, definiendo esta concentración como la CIM. La cantidad estimada de H₂O₂ producida por *S. sanguinis* fue de 0,059 µM en todas las etapas de crecimiento.

Conclusiones: De acuerdo a los resultados obtenidos y a las limitaciones del estudio, se puede concluir que *S. sanguinis* no inhibe el crecimiento de *C. albicans*. Asimismo, ambos podrían contribuir en mantener el pH del microambiente en niveles compatibles con salud oral.

El co-cultivo de *C. albicans* con *S. mutans* podría beneficiar el crecimiento de la bacteria, en desmedro de la levadura. No obstante, cuando la levadura proviene de una biopelícula cariogénica, su relación con la bacteria podría tornarse más sinérgica. Entonces, el rol de *C. albicans* dentro del proceso de caries podría depender de la condición que presenta el microambiente, previo a la presencia de la levadura.

El H₂O₂ podría influir negativamente en el crecimiento de *C. albicans*, sin embargo, este efecto estaría supeditado a su concentración en el medio.

MARCO TEÓRICO:

Introducción

El ser humano presenta un amplio número de sitios susceptibles de ser colonizados por microorganismos. En este contexto la cavidad oral tiene la particularidad de presentar simultáneamente superficies blandas (mucosas) y duras (dientes o prótesis dentales) (Scully y cols., 2008). Sólo en la cavidad oral se estima que coexisten alrededor de 1300 especies de microorganismos diferentes (Zhu y cols., 2014). De éstos, solamente el 54% están oficialmente identificados (HOMD: Oral Human Microbiome Database, disponible en: <http://www.homd.org/>).

Se ha descrito que esta colonización es de naturaleza poli microbiana, con diversos tipos de células procariontes y también eucariontes, cuyas interacciones entre ellas aún no se han comprendido y establecido en su totalidad.

Como las enfermedades orales ocurren principalmente por la alteración del equilibrio dentro de la comunidad microbiana, un mayor entendimiento de las interacciones entre las distintas especies es fundamental para proveer mejores directrices en la implementación de nuevos tratamientos o acciones preventivas para las enfermedades que afectan o tienen sus inicios en el sistema estomatognático (Díaz y cols., 2014), y que podrían eventualmente causar un compromiso sistémico en el paciente, principalmente la caries dental y la enfermedad periodontal.

Caries Dental

La caries dental es considerada la segunda enfermedad más prevalente del ser humano, superada sólo por el resfriado común, y afecta al 90% de la población mundial (Petersen, 2004; Islam y cols., 2007). En niños es 5 veces más prevalente que el asma bronquial, que es la segunda enfermedad más común en dicho grupo

etéreo (Simón-Soro y Mira, 2015). Es además la principal causa de pérdida dentaria y de dolor en la cavidad oral (Edelstein, 2006).

El proceso de caries es causado por la disolución de los cristales de hidroxiapatita que conforman el esmalte, la dentina y el cemento radicular, debido al descenso del pH provocado por los metabolitos de carácter ácido resultantes de la fermentación de carbohidratos provenientes de la dieta del hospedero. Lo anterior en el contexto del metabolismo de bacterias del tipo acidogénicas, es decir que producen ácido, y acidúricas, es decir, que son capaces de vivir en el ambiente ácido que ellas mismas generan, como por ejemplo, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y *Lactobacillus* spp. (Featherstone, 2008; Ferreira-Nóbilo y cols., 2015).

Microbiología en la Cavidad Oral

Previo al nacimiento, la cavidad oral es considerada estéril y está compuesta sólo por superficies mucosas. Inmediatamente posterior al nacimiento, los diversos microambientes de la boca tales como superficies mucosas, surco gingival, saliva y posteriormente, la estructura dentaria, presentan las condiciones de humedad, temperatura, pH y de disponibilidad de nutrientes óptimas para que diversas especies microbianas puedan comenzar a colonizar (Cephas y cols., 2011). De este modo, tan pronto como el diente comienza su proceso de erupción, el esmalte es cubierto por la denominada película salival adquirida, que contiene moléculas del hospedero, tales como glicoproteínas, glicolípidos, proteínas y lípidos, las cuales permiten a los microorganismos adherirse y comenzar el proceso de colonización (Buscher y Van Der Meri, 2000).

En condiciones de salud oral las bacterias predominantes en la superficie dentaria son del género *Streptococcus* (8-86%), seguidas por las del género *Actinomyces* (10-46%) y en menor medida bacilos anaerobios Gram positivos (0-21%) (Marsh y Bradshaw, 1999).

Una vez establecidos en el hospedero, un reducido porcentaje de

microorganismos (cerca al 1%) puede sobrevivir de manera aislada o planctónica, el resto lo hacen organizados en comunidades denominadas biopelículas (Ramadan y cols., 2005). Es esta última forma de vida la causante de la mayor cantidad de enfermedades infecciosas de origen microbiano en el ser humano (Hall-Stoodley y Stoodley, 2009).

Biopelículas en la cavidad oral

Una biopelícula se define como una comunidad heterogénea de microorganismos, los cuales pueden ser de naturaleza eucarionte (hongos o protozoos), procarionte (bacterias o archaeas) o viral, que se adhieren a superficies vivas o inertes y que pueden estar inmersos en una matriz extracelular (MEC) compuesta por exopolisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Harriot y Noverr, 2011).

Los distintos microorganismos pertenecientes a esta comunidad se comunican entre ellos mediante señales químicas-biológicas que pueden difundir a través de la MEC, en un proceso denominado “*quorum sensing*” (QS), que es representado por la producción, secreción y captación de las denominadas moléculas QS, las cuales pueden ser tanto genéricas como específicas (Krom y cols., 2014).

Una vez que las primeras especies de microorganismos, denominados colonizadores primarios o tempranos, ingresan a la cavidad oral, se genera la biopelícula inicial, el cual ofrece nuevas superficies que permiten la incorporación de otras especies, los colonizadores tardíos, quienes comienzan a modificar la composición de la biopelícula inicial. Para el éxito de esta biopelícula es de vital importancia que exista coagregación entre los distintos miembros de esta comunidad, esto significa que se requiere una cierta proximidad célula-célula que permita el intercambio y difusión de moléculas de señalización y nutrientes (Podbielski y Kreikemeyer, 2004).

Las bacterias del género *Streptococcus* están entre las primeras colonizadoras de los tejidos orales, esto se logra debido a la liberación de una gran batería de

moléculas y proteínas de superficie celular que permiten el reconocimiento de receptores celulares tanto de microorganismos, como por ejemplo, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans* (*C. albicans*), entre otras, como también del hospedero (Kerrigan y cols., 2007; Daep y cols., 2008).

La cavidad oral está constantemente embebida en saliva, una secreción que si bien tiene altas propiedades antimicrobianas, antivirales y antifúngicas (Hanning y cols., 2005), también ayuda en múltiples aspectos a la colonización microbiana. La saliva es rica en moléculas biológicas activas que se encuentran a completa disposición de los microorganismos, y representa para ellos la mayor fuente de carbohidratos y péptidos (Nasidze y cols., 2009). Algunos *Streptococcus* orales producen adhesinas específicas que interactúan con proteínas salivales que se encuentran sobre el diente y las mucosas (Nobbs y cols., 2009). Se ha descrito que las glicoproteínas salivales juegan un rol importante, ya que al unirse selectivamente a ciertos componentes bacterianos, facilitan la unión de microorganismos con el hospedero y también con otras especies microbianas (Struzycka, 2014). Del mismo modo, algunas proteínas salivales básicas ricas en prolina, podrían actuar como receptores para la unión de algunos *Streptococcus* orales a la película salival adquirida (Marsh, 2005), como por ejemplo, a *S. gordonii*, que puede unirse a dichas proteínas gracias a la expresión de la proteína de superficie Hsa (Nobbs y cols., 2007).

De los *Streptococcus* orales, *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), anaerobio facultativo Gram positivo, es miembro de la microbiota endógena del ser humano. En la cavidad oral es considerado uno de los principales colonizadores primarios asociados a salud, por lo que juega un rol importante en el inicio de la formación de la biopelícula (Nobbs y cols., 2009). *S. sanguinis* tiene la capacidad de secretar agentes antimicrobianos, como proteínas intracelulares y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que tendrían efectos inhibitorios sobre algunos patógenos periodontales, como *Prevotella intermedia* y *P. gingivalis*, y también sobre células fúngicas del tipo levaduras como *Candida albicans* (*C. albicans*) y *C. tropicalis*, sin embargo, el mecanismo implicado sobre estas últimas es aún desconocido (Ma y cols., 2014).

La formación de esta biopelícula es entonces el resultado de complejas interacciones sinérgicas, mutualistas y antagonistas entre los distintos microorganismos (Kuramitsu y cols., 2007). Estas interacciones entre bacterias, bacteria-hongo y entre hongos ocurren tanto en estado de salud oral como de enfermedad y pueden ser benéficas o perjudiciales para el hospedero. Es por lo tanto, el balance mantenido por las interacciones entre los participantes de la comunidad, el ambiente y hospedero el que va a definir el estado de salud del mismo (Shirliff y cols., 2009; Krom y cols., 2014). Las interacciones sinergistas y mutualistas brindan múltiples beneficios para los microorganismos pertenecientes a esta comunidad ecológica. Se ha observado que la levadura *C. albicans* tiene la capacidad de resistir de mejor manera las acciones del hospedero y de antifúngicos viviendo dentro de una biopelícula que haciéndolo en forma planctónica (Samaranayake y cols., 2002). Además, clínicamente, las infecciones causadas por biopelículas presentan problemas de tratamiento debido a la mayor resistencia de esta forma de vida frente a diversas terapias antibióticas. Sumado a esto, la naturaleza polimicrobiana de las biopelículas exige que en diversas ocasiones deban emplearse tratamientos más complejos y especie-específicos para los distintos tipos de microorganismos (Harriot y Noverr, 2011).

El desarrollo de la biopelícula resulta de un proceso altamente competitivo en donde los colonizadores tardíos utilizan diferentes mecanismos para, en un estado de salud, mantener una homeostasis con los colonizadores primarios (Kreth y cols., 2009).

En la cavidad oral, la colonización inicial ocurre en presencia de una alta tensión de oxígeno. Dicha condición en el microambiente permite que un vasto número de bacterias del género *Streptococcus* realicen sus procesos de respiración celular, con la consecuente producción de metabolitos y factores de virulencia, entre los cuales destaca el H_2O_2 (Ramos-Montañez y cols., 2008). Esto gracias a la presencia de enzimas del tipo oxidasa como Piruvato oxidasa (Pox) y NADH oxidasa (Nox) (Tittmann y cols., 2005).

El H_2O_2 , subproducto del crecimiento aeróbico, está muy relacionado con la competencia y coexistencia dentro de las mismas biopelículas, ya que es inhibitorio del crecimiento de otros microorganismos co-residentes susceptibles a él. *S. sanguinis* y *S. gordonii* producen y secretan H_2O_2 como compuesto antimicrobiano al competir con otros streptococci orales (Zhu y Kreth, 2010). Ensayos *in vitro* realizados por Ge y cols. (2016) muestran que, en anaerobiosis, colonias mutantes negativas para Nox (Nox^-) de *S. sanguinis*, tienen un recuento de colonias considerablemente menor que el grupo control (que no presentaba delección del gen que codifica para Nox). Asimismo, los ensayos de competencia realizados por Kreth y cols. (2008) describieron que cepas mutantes negativas para Pox (Pox^-) de *S. sanguinis* y *S. gordonii* son incapaces de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, la cual ha reportado, junto a otras bacterias como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), ser susceptible al efecto bacteriostático del H_2O_2 producido en bajas concentraciones (Kreth y cols., 2005; Uehara y cols., 2006; Baldeck y Marquis, 2008).

Levaduras del género *Candida*

Dentro del grupo de los hongos se encuentran las levaduras del género *Candida*, dentro del cual se han aislado más de 150 especies desde la cavidad oral, muchas de las cuales son colonizadoras comensales en el ser humano (Peleg y cols., 2010; Gow y cols., 2011). Estas levaduras pueden llegar a ser patógenos oportunistas o patobiontes (Simón-Soro y Mira, 2015) que, cuando logran superar las defensas del hospedero, pueden provocar diversas patologías, con más frecuencia en pacientes que presentan su sistema inmune deprimido, ya sea por quimioterapia o bien por ser portadores de VIH, o que permanecen por tiempos prolongados en tratamiento con antibióticos de amplio espectro, entre otras (Jin y cols., 2004).

Dentro de este género, *C. albicans* es considerada la especie oportunista más frecuentemente aislada y la más patogénica del género (Schulze y cols., 2009). Se estima que es la causante de un 90% de las infecciones fúngicas a nivel

sistémico (Nobbs y cols., 2010), seguido de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Trofa y cols., 2008). Es además, la tercera causa de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo (Perlroth y cols., 2007). Sólo para el tratamiento de estas enfermedades EEUU gasta entre 2-4 billones de dólares /año (Wilson y cols., 2002).

C. albicans es una levadura unicelular que tiene la capacidad de vivir como un microorganismo comensal en los órganos genitales, en el tracto gastrointestinal y en la cavidad oral (Soll, 2002). Sin embargo, puede llegar a causar desde infecciones comunes como estomatitis e infecciones genitales, hasta candidiasis de distinto grado de severidad (Pfaller y Diekema, 2007). A nivel oral, se estima que la estomatitis asociada a *Candida* afecta a más del 65% de los portadores de prótesis removibles (Williams y cols, 2011).

C. albicans tiene la capacidad de colonizar catéteres, stents, implantes y prótesis dentales, debido a la gran cantidad de proteínas de adhesión expresadas en su superficie celular. Asimismo, estas proteínas desempeñan diversas funciones en la formación de la biopelícula, donde son protagonistas de diversas interacciones biológicas con los otros microorganismos presentes en ella (Jenkinson y Douglas, 2002). Es así como se ha descrito que *C. albicans* puede coagregar con colonizadores tempranos como *S. gordonii*, *S. sanguinis* y *S. oralis* (Bamford y cols., 2009; Díaz y cols., 2014). Estudios han concluido que *S. gordonii* gatilla algunos factores de virulencia de *C. albicans* (Ricker y cols., 2014), y que otros *Streptococcus* actuarían de manera similar (Xu y cols., 2014). *C. albicans* desarrolla hifas que permiten la unión con *S. gordonii* vía proteínas de pared celular como SspA y SspB, presentes en la superficie de dicha levadura (Bamford y cols., 2009). Además, *S. aureus* también utiliza las hifas de *C. albicans* previamente establecidas para adherirse a la biopelícula (Harriott y Noverr, 2010; Peters, 2010).

La capacidad que tiene *C. albicans* para mantenerse en la cavidad oral y causar patología, en ciertos casos, se debe en gran medida a la amplia cantidad de

factores de virulencia que posee, por ejemplo, la producción de enzimas extracelulares, de las cuales fosfolipasa B, lipasas y aspartil proteinasas (SAPs) son consideradas las más importantes (Naglik y cols., 2003). En relación a lo anterior, *C. albicans* posee diez genes *SAP*, cuyas expresiones dependen de las condiciones ambientales y del hospedero (Naglik y cols., 2003). Solamente la proteasa *SAP2* se expresa en altas cantidades en cultivos de esta levadura (Koelsch y cols., 2000). Esta levadura además produce fosfatasas alcalinas, hialuronidasas y condroitinsulfatasas que degradan componentes de la MEC. Las *SAPs* se relacionan con la adhesión a la estructura dentaria, además de la degradación de proteínas y componentes de la MEC (Li y cols., 2014). Análisis *in vivo* realizado por Naglik y cols. (1999), determinaron que los genes *SAP2*, *SAP4* y *SAP6* son los que se expresan predominantemente en cavidades orales tanto en sujetos sanos que portan estas levaduras como en sujetos con candidiasis oral, mientras que *SAP1*, *SAP3*, *SAP5* y *SAP7* se expresan sólo en pacientes con candidiasis oral. La patogénesis de *Candida* podría entonces tener estrecha relación con el tipo de *SAP* expresada. Además, se ha observado una mayor producción de hifas y sobreexpresión de *SAP2* y *SAP6*, entre otros genes, en biopelículas de *C. albicans* con *S. sanguinis* y *S. mutans* comparado con biopelículas sólo de *C. albicans* sobre superficies de titanio (Cavalcanti y cols., 2016). Resultados similares se obtuvieron con *SAP4* y *SAP6* en superficies acrílicas (Cavalcanti y cols., 2015). *SAP1*, por su parte, aumenta su expresión en niños con Caries Temprana de la Infancia (CTI) (Li y cols., 2014). Aunque la expresión de estas enzimas en biopelículas mixtas es aún incierta, se puede inferir una relación positiva entre la virulencia de esta levadura y la expresión de dichas proteínas.

Por otro lado, *Candida* está constantemente expuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS), como el H_2O_2 , producido tanto por otros microorganismos como por algunas células fagocíticas del hospedero (Brown, 2011). Este agente químico provoca estrés genotóxico y oxidativo en la levadura, además promueve el crecimiento filamentoso (Nasution y cols., 2008). Para prevenir y/o reparar este daño la levadura tiene sistemas de detoxificación de ROS presentes en ella, tales

como: activación de los genes de catalasa y la inducción de sistemas antioxidantes, que utilizan glutatión o tioredoxina como agentes reductores, en reacciones que son catalizadas por las enzimas glutatión peroxidasa y peroxiredoxina, respectivamente. Estos tres sistemas en conjunto definen la capacidad antioxidante total de la levadura. De éstos, la activación del gen de la catalasa es considerada la más importante en la eliminación del H_2O_2 del medio (Abegg y cols., 2012; Komalapriya y cols., 2015). Para la mantención de estos sistemas es imprescindible la presencia de NADPH, que es obtenido a partir de la vía de las pentosas-fostato (Komalapriya y cols., 2015). También se ha descrito que *C. albicans* libera farnesol, una molécula relacionada con la comunicación célula-célula que participa también como respuesta frente a daño oxidativo (Westwater y cols., 2005). Farnesol podría ser una molécula moduladora de la biopelícula afectando la sobrevivencia de otros microorganismos tales como las bacterias.

Otra habilidad muy importante para la patogénesis de la candidiasis es la capacidad de *C. albicans* de adoptar diferentes formas de crecimiento, ya sea como una célula única (forma de levadura) o como forma filamentosa (hifa o pseudohifa) (Berman, 2006), importantes para su diseminación e infección, adhesión y formación de biopelículas, respectivamente (Bastidas y Heitman, 2009). La forma de hifa también protege a la levadura de la fagocitosis y promueve la invasión a las superficies epiteliales (Williams y cols., 2011). El cambio de morfología de levadura a hifa o viceversa, es considerado el factor de virulencia más importante de este microorganismo (Bastidas y Heitman, 2009) y puede estar influenciado por diversas variables. Se ha descrito que metabolitos bacterianos, como algunos péptidos secretados por *S. mutans*, pueden influenciar vías involucradas en la transición hifa/levadura de *C. albicans*. Cavalcanti y cols. (2015) concluyen que la presencia de bacterias específicas promueve la proliferación de *C. albicans* en estado de hifa, resaltando su invasión de tejidos. Asimismo, el co-cultivo de la levadura con otros *Streptococcus* spp. puede provocar un descenso del pH en el microambiente circundante e inactivar ciertos factores de transcripción involucrados en la formación de hifas. Por lo tanto, el pH

podría influenciar también esta transición morfológica (Gow y cols., 2011). Del mismo modo se ha observado que algunas proteínas salivales como las estaterinas inducen la formación desde un estado de hifa a uno levaduriforme, lo que podría considerarse un mecanismo de defensa del hospedero contra la candidiasis (Leito y cols., 2009).

La formación de una biopelícula también es muy favorable para esta levadura, ya que le permite resistir la acción limpiadora del flujo salival y de las moléculas de defensa del hospedero (Williams y cols., 2011), además de brindar mayor resistencia a antifúngicos como el fluconazol, sobre todo si esta biopelícula está compuesta también por bacterias. Se ha descrito que las células fúngicas modulan la acción de antibióticos y a su vez las bacterias afectan la actividad de agentes antifúngicos en biopelículas mixtas (Jenkinson y Douglas, 2002; Douglas, 2002).

Microbiología de la Caries Dental

Las características microbiológicas de la caries dental hacen que, actualmente, los postulados de Köch no sean aplicables a ella, por lo que es considerada una enfermedad infecciosa no clásica. Esto por ser un proceso multifactorial, con un elevado número de microorganismos no específicos involucrados en una misma lesión, los cuales además van a depender del tejido dentario afectado (Fejerskov, 2004).

Análisis taxonómicos realizados por Simón-Soro y cols. (2013) indican que la composición microbiana de una biopelícula cariogénica varía según el tejido afectado, habiendo una sucesión microbiana entre una etapa y otra. Es así como en una primera instancia, en las lesiones confinadas a esmalte, hay un predominio de bacterias del tipo acidogénico, las cuales por su ubicación tienen mejor acceso a los carbohidratos fermentables de la dieta, y en donde *S. mutans*, entre otros *Streptococcus* spp., es relativamente común. Sin embargo, cuando la lesión de caries avanza hacia el tejido dentinario, la biopelícula (y la proporción de *S.*

mutans) comienza a cambiar considerablemente, predominando ahora especies proteolíticas pertenecientes al género *Prevotella* o *Fusobacterium*, entre otras. Lo anterior se condice con el hecho de que el tejido dentinario tiene una menor proporción de tejido mineralizado y más materia orgánica, con un pH crítico de desmineralización mayor (6,7 aprox.) (Simón Soro y cols., 2013).

En condiciones de salud oral (ausencia de caries), *S. sanguinis* es considerada una bacteria antagónica de *S. mutans* (Becker y cols., 2002). Esto fundado en el hallazgo de que en dicha condición se han observado altos recuentos de *S. sanguinis* en placa dental con bajos niveles de *S. mutans*, y por el contrario, en condiciones de caries, se han observado altos recuentos de *S. mutans* en placa dental versus bajos recuentos de *S. sanguinis* (Ge y cols., 2008).

Cabe destacar que durante décadas, *S. mutans* fue considerado el principal agente causal en la caries dental y por ende era el objetivo más importante de las estrategias terapéuticas. No obstante, con los nuevos métodos de secuenciación en base a ADN, ARNr 16S y estudios metagenómicos de especies obtenidas desde saliva y/o lesiones de caries, concluyen que *S. mutans* sólo conformaría alrededor del 0,7-1,6 % de la totalidad de especies involucradas en el proceso de caries, y tan sólo el 0,1 % de las bacterias que conforman la placa dental (Simón-Soro y cols., 2013; Simón-Soro y Mira, 2015).

El disacárido sacarosa proveniente de la dieta es utilizado por las enzimas glucosiltransferasas (Gtfs) de *S. mutans* para producir exopolisacáridos, que son un componente esencial y básico para el inicio de la construcción de la MEC de una biopelícula cariogénica (Bowen y Koo, 2011). Gregoire y cols. (2011) concluyeron que las enzimas Gtfs de *S. mutans* se unen a las hifas de la levadura *C. albicans*, lugar donde esta célula fúngica produce exopolisacáridos (Morales y Hogan, 2010), ayudándola a producir una MEC rica en glucanos que favorecen la instalación de *S. mutans* en la superficie dental, lo que sugiere que estos microorganismos desarrollan una relación simbiótica que realza la virulencia de ambas. Por otro lado, ambos microorganismos son al mismo tiempo considerados

acidogénicos y ácidotolerantes, además de crecer juntos en presencia de sacarosa (Jin y cols., 2004; Klinke y cols., 2009; Falsetta y cols., 2014).

Análisis genómicos han encontrado también secuencias de ADN compatibles con levaduras del género *Candida*, principalmente *C. albicans*, tanto en lesiones de esmalte como de dentina (Simón-Soro y cols., 2013). En niños con CTI, además de los elevados recuentos de *S. mutans*, también se han encontrado altos recuentos de *C. albicans*, lo que se condice con el hecho de que en niños libres de CTI, esta levadura ha sido débilmente encontrada (de Carvalho y cols., 2006; Yang y cols., 2012). Raja y cols. (2010) plantean una relación positiva entre la presencia de caries en niños escolares entre 6 y 12 años y el recuento de *C. albicans*. Esto al observar que dichas levaduras podían no aislarse en un niño con boca sana, sin embargo, en la saliva de un niño con caries, siempre se encontraban presentes y en altos recuentos.

C. albicans posee la capacidad de metabolizar azúcares de la dieta formando también ácidos, como ácido pirúvico y acético, que podrían ayudar a la disolución de la hidroxiapatita del esmalte y la dentina (Nikawa y cols., 2003). Por todo lo anteriormente mencionado se puede sugerir que *C. albicans* estaría asociada con la patogénesis tanto de la CTI, como de la caries dental en general, pudiendo favorecer su inicio, severidad y extensión (Raja y cols., 2010).

Si bien hay descritas interacciones entre *C. albicans* y diversos microorganismos, los tipos de interacciones y mecanismos entre bacteria-hongo o entre esta levadura y los colonizadores tempranos de la biopelícula oral no están claramente entendidos. Por lo tanto, estudiar la relevancia de lo mencionado anteriormente en salud y enfermedad oral es pertinente.

Debido a los antecedentes expuestos, es necesario desarrollar estudios que ayuden a abrir el conocimiento acerca de interacciones existentes entre estas levaduras, tanto con los microorganismos colonizadores de la biopelícula dental como con aquellos dominantes de una biopelícula cariogénica, para determinar el

tipo de interacción biológica (antagonismo, sinergismo, inhibición del crecimiento) que pueda existir entre ellos, de tal manera ir revelando la coexistencia entre estos microorganismos co-residentes en la cavidad oral. Es en ese contexto que esta propuesta de investigación pretende aportar de manera preliminar, si existe una modulación del crecimiento por parte de *S. sanguinis* hacia *C. albicans*, cuando se someten a ensayos de co-cultivo. Esto es analizar un efecto de competencia de la levadura con colonizadores tempranos, principalmente *S. sanguinis* (a través de H_2O_2) para mantener la levadura en niveles reducidos compatibles con salud oral (analizando su crecimiento y expresión del gen *SAP2*, uno de los principales factores de virulencia).

Este estudio podría brindar información relevante para posibles tratamientos futuros contra la caries dental, ya no solamente desde el punto de vista bacteriano o fúngico de manera aislada sino que entendiendo que las interacciones fúngicas y bacterianas influyen la transición de salud a enfermedad en el hospedero (Peleg y cols., 2010).

HIPÓTESIS:

1. La viabilidad de *Candida albicans* disminuye al co-cultivar la levadura con *S. sanguinis*.
2. La expresión del gen *SAP2* de *Candida albicans* disminuye al cultivarla en presencia de H_2O_2 .

OBJETIVOS:**OBJETIVO GENERAL:**

1. Determinar el efecto de co-cultivar *S. sanguinis* con *C. albicans* sobre el crecimiento de la levadura.
2. Medir el efecto del H_2O_2 en el crecimiento y en la expresión del gen *SAP2* de la levadura.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar la viabilidad de *C. albicans* en ensayos de competencia con *S. sanguinis*.
2. Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de H_2O_2 que inhiba el crecimiento de *C. albicans*.
3. Cuantificar la producción de H_2O_2 de *S. sanguinis* en cultivo líquido.
4. Analizar la expresión del gen *SAP2* en *C. albicans* al cultivarla en presencia de la MIC de H_2O_2 .

MATERIALES Y MÉTODOS:

Tipo de estudio: Experimental, descriptivo y cuantitativo.

Cepas bacterianas y de levaduras: Se utilizaron las bacterias orales *Streptococcus sanguinis* SK36¹ y *Streptococcus mutans* obtenida desde American Type Cell Collection (ATCC) 25175 (usada como control), además, la levadura *Candida albicans* ATCC 90029. Se utilizó también un aislado clínico de *C. albicans* denominado P1-1 (confirmado por análisis microbiológico, PCR y secuenciación), proveniente de una muestra de saliva total no estimulada de un niño preescolar con caries con un índice ICDAS II= 6².

Por lo tanto, en este proyecto se trabajaron solo con los cuatro microorganismos mencionados y no con muestras biológicas.

Ensayos de inhibición del crecimiento: Fueron realizados en medio sólido y líquido según Kreth y cols. (2008), con modificaciones. Brevemente, ensayos en medio sólido fueron realizados en placas con medio Todd Hewitt Broth (THB; BBL, BD) agar en las cuales se sembraron 10 µL de un cultivo del microorganismo colonizador (*S. sanguinis*/*S. mutans* o *C. albicans* ATCC/P1-1) y 10 µL del microorganismo competidor (*S. sanguinis*/*S. mutans* o *C. albicans* ATCC/P1-1) de manera simultánea y diferida, a una densidad óptica de 600 nm de longitud de onda (D.O._{600nm}) de 0,36 y 0,5 para bacterias y 0,38, 0,6 y 0,8 para levaduras, e incubados durante 16 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Luego del período de incubación, en los cultivos diferidos, se sembró el microorganismo competidor en la misma placa, muy próximo al microorganismo colonizador, casi tocándose. La placa fue nuevamente incubada durante 16 h. La inhibición del crecimiento fue evaluada en términos de la presencia/no presencia de una zona de inhibición proximal en la vecindad de uno de los microorganismos.

¹ Cepa bacteriana cedida por el Dr. Jens Kreth, perteneciente a la Universidad de Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma, Estados Unidos.

² La obtención de esta muestra fue realizada en el marco del ya finalizado Proyecto Fondecyt N° 3120164 "Efecto de factores de virulencia de *Lactobacillus casei* y *Candida albicans* sobre parámetros de crecimiento y viabilidad celular de *Streptococcus sanguinis*: un colonizador temprano del *biofilm* dental en ausencia de caries".

Para ensayos en medio líquido, se inocularon de forma aislada, simultánea y diferida (24 h de diferencia entre microorganismo colonizador y competidor) *S. sanguinis*/*S. mutans* (15 μ L de cada una) con *C. albicans* ATCC/aislado clínico (15 μ L de cada una) a una D.O._{600nm} de 0,6 para bacterias y 0,38 para levaduras en 1 mL de medio THB estéril en una placa para cultivo celular de 24 pocillos Costar (Corning, Inc., Corning, NY), para crecimiento en co-cultivo. Los microorganismos fueron incubados durante 48 h con agitación en condiciones de microaerofilia a 37 °C. A las 24 y 48 h de incubación, se tomaron alícuotas de los cultivos, los cuales fueron diluidos en serie (10^{-5} y 10^{-6} v/v) y sembrados en placas con medio Brain Heart Infusion (BHI; BBL, BD) agar y Sabouraud-Dextrosa (SD; BBL, BD) agar suplementado con tetraciclina a una concentración final de 5 μ g/mL. Las alícuotas de cultivo en ambos medios con agar se sembraron por duplicado, para el desarrollo de colonias de bacterias y levaduras, respectivamente. Luego del período de incubación se realizó el recuento de las colonias desarrolladas, expresándolas en Unidades Formadoras de Colonias por mL de cultivo (UFC/mL). Además, se midió pH al inicio y al final del experimento.

Test de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC): Se realizaron para evaluar la concentración de H₂O₂ que disminuye el crecimiento de *C. albicans* (ATCC o aislado clínico). Se sembró la cepa de referencia de la levadura *C. albicans* en placas con medio SD agar suplementado con distintas concentraciones de H₂O₂ (0,1 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM) para posteriormente obtener el recuento de colonias viables (UFC/mL). Las placas fueron incubadas en condiciones aeróbicas durante 48 h a 37 °C.

Determinación de la concentración de H₂O₂ de *S. sanguinis*: Se realizó en cultivo líquido, según Gilliland (1968) y modificado por Kreth y cols. (2008). Brevemente, la bacteria fue cultivada en medio BHI hasta fase estacionaria. Se colectaron muestras de cultivo en fase de latencia, fase exponencial temprana, tardía y fase estacionaria. Las muestras (1 mL) fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se esterilizó mediante filtros de tamaño de poro 0,22 μ M (Merck Millipore) y se transfirió a un tubo estéril. Posteriormente,

200 μL de sobrenadante se mezcló con 0,8 mL de buffer fosfato 10 mM pH 7,4; 0,16 mM de o-dianisidine (Sigma-aldrich), 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima peroxidasa de rábano (Pierce) y 0,02 % de triton x-100 (Calbiochem). La mezcla se incubó a 37 °C durante 20 min. La absorbancia fue medida a 570 nm y la concentración de H_2O_2 fue calculada de acuerdo a una curva estándar previamente diseñada con una solución stock de H_2O_2 al 30 % (Merck Millipore).

Curvas de crecimiento: Una vez obtenida la MIC (definida en 0,1 mM), se realizaron curvas de crecimiento de la levadura en medio SD líquido con 0 mM (control), 0,1 mM y 0,5 mM de H_2O_2 . Durante la progresión de la curva, se midió D.O._{600nm} en 7 puntos diferentes (correspondientes al inicio de la curva de crecimiento y a las distintas fases del crecimiento: latencia, exponencial temprana, exponencial media, exponencial tardía, estacionaria temprana y estacionaria tardía), con intervalos de 4 h aprox. entre cada uno de ellos, en condiciones de aerobiosis a 37 °C. Además, se tomaron alícuotas de cultivo para medir la expresión del gen *SAP2* de *C. albicans* durante su crecimiento en dicha curva.

Análisis de datos: Los datos fueron analizados de manera descriptiva, comparando medianas dentro de un mismo grupo y entre distintos grupos.

RESULTADOS:

Objetivo 1: Viabilidad de *C. albicans* en ensayos de competencia con *S. sanguinis*.

Se analizó el potencial inhibitorio de la bacteria sobre la levadura, estableciendo un ensayo control entre *C. albicans* y *S. mutans*.

Ensayos en medio sólido mostraron una disminución del crecimiento de *S. sanguinis* (D.O._{600nm} = 0,36 y 0,5) y del control *S. mutans* (D.O._{600nm} = 0,36 y 0,5) al ser cultivadas como competidoras respecto de las dos cepas de *C. albicans* (ambas a una D.O._{600nm} = 0,8) (Figura 1A, 1B). Para todas las D.O. restantes, tanto al cultivarse simultáneamente bacterias (*S. sanguinis* y *S. mutans*) con *C. albicans* (cepa de referencia o aislado clínico), como cuando estas últimas fueron sembradas como competidoras, no se evidenció presencia de halo inhibitorio.

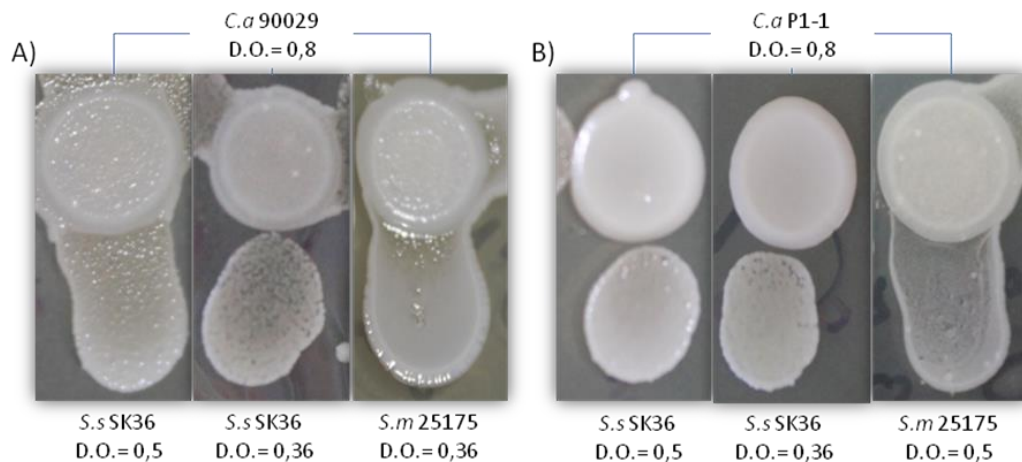


Figura 1: Reducción del crecimiento de *S. sanguinis* (S.s) y *S. mutans* (S.m) producido por *C. albicans* (C.a) en medio THB, en condiciones de microaerofilia. (A) *C. albicans* ATCC 90029 como colonizadora e incubada durante 16 h a 37 °C. (B) *C. albicans* P1-1 como colonizadora e incubada durante 16 h a 37 °C.

Ensayos de co-cultivo en medio líquido muestran que ambas levaduras, al cultivarse con *S. sanguinis*, aumentaron su crecimiento al inocularse simultáneamente durante 48 h, como colonizadoras y, en el caso de la cepa de

referencia, también como competidora, en comparación con su crecimiento aislado a las 24 y 48 h. Además, el aislado clínico de *C. albicans* mostró un mayor crecimiento al ser co-cultivado tanto de forma simultánea durante 48 h como colonizador, en comparación con la cepa de referencia de la levadura (Figura 2A).

Por otro lado, ambas cepas de la levadura, al co-cultivarse con *S. mutans*, disminuyen su crecimiento en todos los tiempos de co-cultivo, respecto de su crecimiento individual a las 24 y 48 h. En todos los co-cultivos, el recuento del aislado clínico fue mayor que el de la cepa de referencia (Figura 2B).

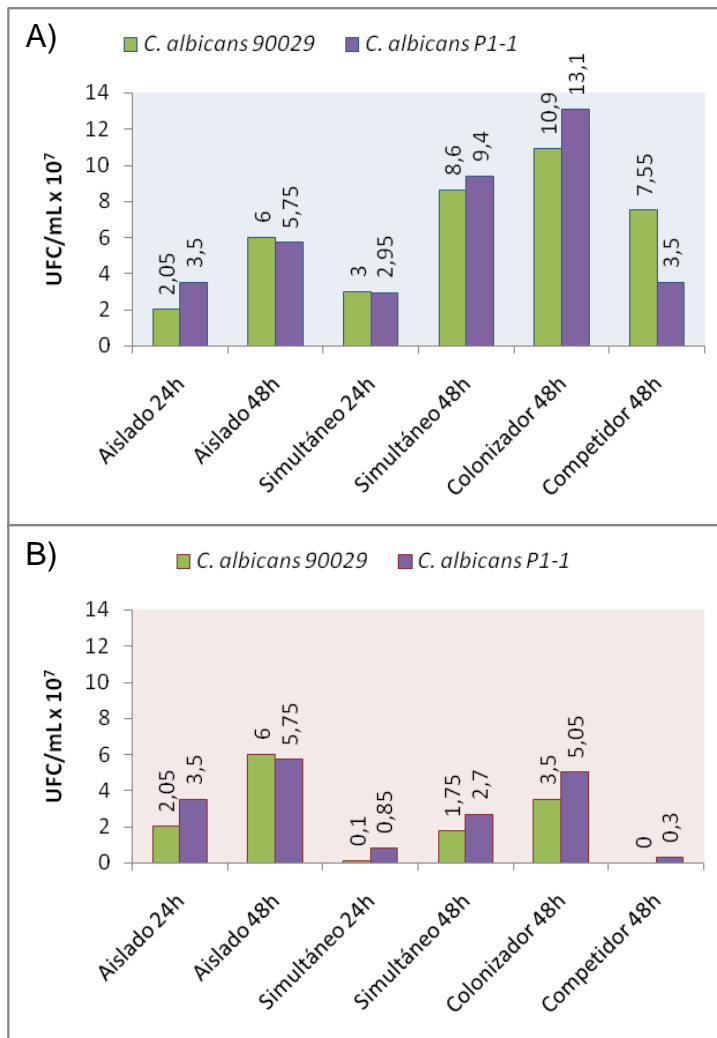


Figura 2: Ensayos de co-cultivo en medio líquido de la levadura *C. albicans* (ambas cepas) con *S. sanguinis* o *S. mutans*. (A) Levaduras inoculadas de manera individual, con *S. sanguinis* simultáneamente y como colonizador o como competidor. (B) Levaduras inoculadas de manera individual, con *S. mutans* simultáneamente y como colonizador o como competidor.

Se tomaron alícuotas de cada cultivo a las 24 y 48 h y se sembraron para el posterior recuento de UFC/ml. Las placas fueron incubadas durante 48 h, en condiciones de microaerofilia a 37 °C.

En el crecimiento bacteriano, los resultados muestran que, con respecto a su crecimiento individual a las 24 y 48 h, *S. sanguinis* aumenta su recuento en todos

los tiempos de co-cultivo, y en mayor medida al ser co-cultivado simultáneamente (24 y 48 h) y como competidor con el aislado clínico de *C. albicans* (Figura 3A).

En el caso de *S. mutans*, en comparación con su cultivo individual, el crecimiento fue mayor con el aislado clínico de *C. albicans* en todos los tiempos de co-cultivo. Del mismo modo, el crecimiento de *S. mutans* con la cepa de referencia de la levadura fue mayor al ser co-cultivadas simultáneamente a las 48 h y cuando la bacteria fue colonizadora. Se obtuvo además que, al co-cultivarse de forma simultánea con la cepa de referencia de *C. albicans*, el crecimiento de *S. mutans* aumentó entre las 24 y 48 h, caso contrario ocurre con el aislado clínico, en donde en el mismo lapso de tiempo el crecimiento de la bacteria descendió (Figura 3B).

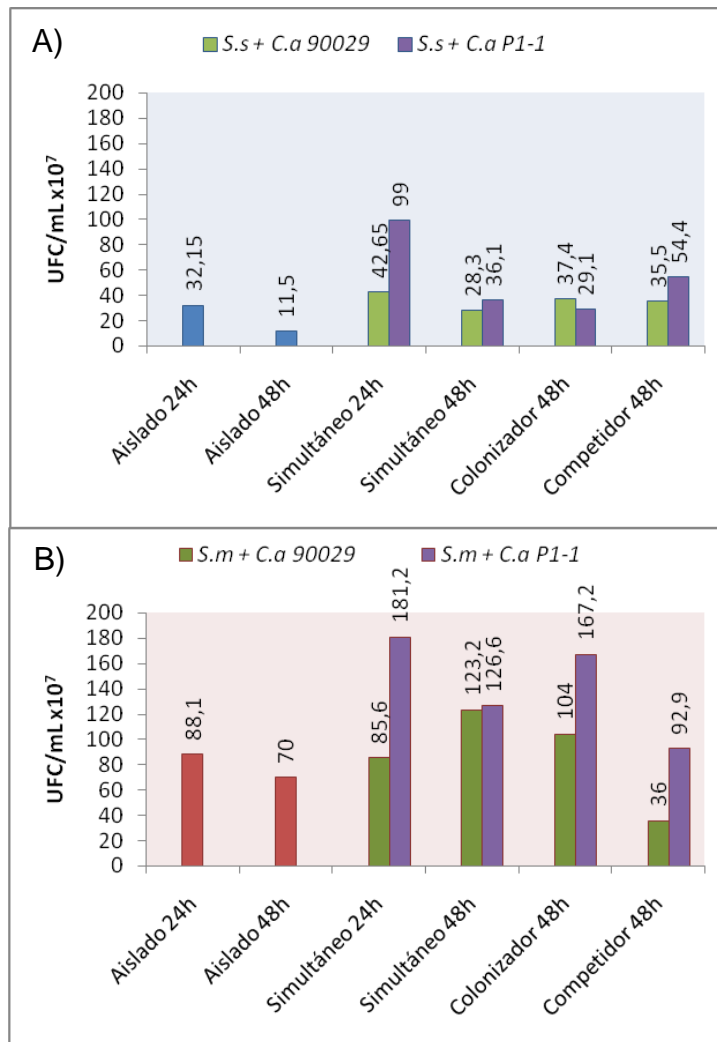


Figura 3: Ensayos de co-cultivo en medio líquido de *S. sanguinis* (*S.s*) o *S. mutans* (*S.m*) con ambas cepas de *C. albicans* (+ *C.a* 90029 o P1-1). (A) Crecimiento de *S. sanguinis*, inoculada de forma individual y con *C. albicans* 90029 o P1-1 simultáneamente, como colonizadora y como competidora. (B) Crecimiento de *S. mutans*, inoculada de forma individual y con *C. albicans* 90029 o P1-1 simultáneamente, como colonizadora y como competidora. Las placas fueron incubadas durante 48 h, en condiciones de microaerofilia a 37 °C.

Ensayos de co-cultivo en medio líquido y pH. Debido a que la acidez del medio es determinante en el crecimiento y prevalencia del tipo de microorganismos presentes, se midió el pH al final de los ensayos de competencia en medio líquido, tanto de los cultivos individuales (*S. sanguinis*, *S. mutans*, *C. albicans* 90029 y P1-1) como mixtos (*S. sanguinis* con *C. albicans* 90029 o P1-1 y *S. mutans* con *C. albicans* 90029 o P1-1). Dichos valores de pH fueron comparados con el pH inicial del medio de cultivo utilizado (7,8) (Figura 4).

Cabe mencionar previamente que, tanto en los cultivos individuales como en los mixtos, los valores de pH final se mantuvieron siempre en niveles básicos. Dicho esto, se obtuvo que los cultivos individuales de *S. sanguinis* y *C. albicans* (ambas cepas) aumentaron el pH del medio, mientras que *S. mutans* lo disminuyó (pH= 7,65) (Figura 4A). En los co-cultivos se observó que *S. sanguinis* con *C. albicans* 90029 o P1-1 provocaron siempre un aumento del pH del medio. Los cultivos de *S. mutans* con *C. albicans* 90029 o P1-1 mostraron también una tendencia a elevar el pH del medio, excepto cuando la bacteria fue colonizadora y la cepa de referencia de la levadura fue competidora, en donde se apreció un descenso en el pH respecto al inicial (pH= 7,61) (Figura 4B).

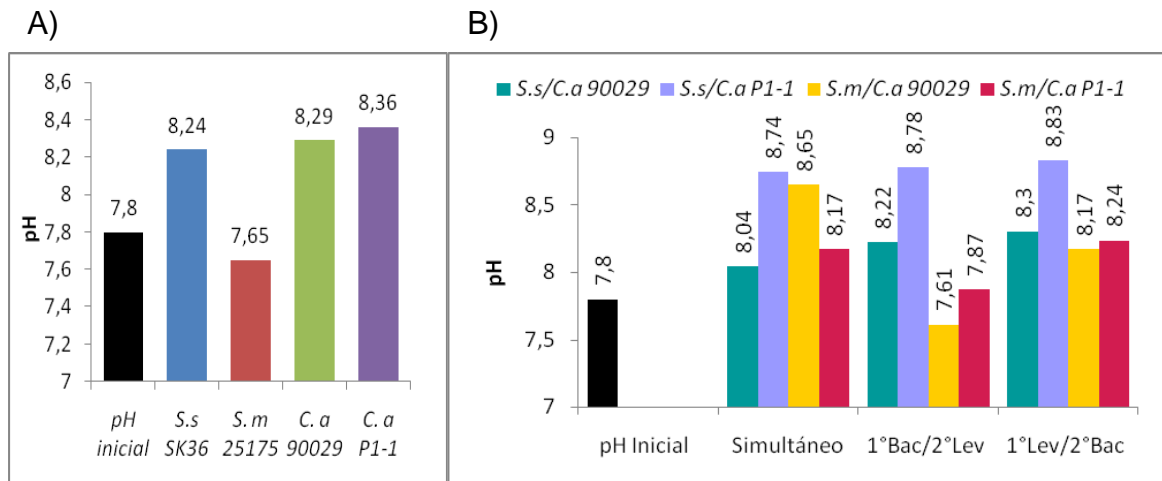


Figura 4: Valores de pH en cultivos individuales y mixtos. (A) pH medido al final del experimento de cultivos individuales de *S. sanguinis* (*S.s*), *S. mutans* (*S.m*), *C. albicans* (*C.a*) 90029 y P1-1. (B) pH medido al final del experimento en cultivos mixtos; la medición se realizó en los cultivos simultáneos, cuando *S.sanguinis* o *S. mutans* fueron colonizadores y *C. albicans* 90029 o P1-1 competidores (1°Bac/2°Lev) y viceversa (1°Lev/2°Bac).

Objetivo 2: Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM) de H_2O_2 que disminuye el crecimiento de *C. albicans*.

Para realizar test de CIM, ambas cepas de la levadura fueron incubadas cada una por sí sola, con concentraciones de 0,1; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4 y 5 mM de H_2O_2 .

Se observó que a 0,1 mM de H_2O_2 , su crecimiento disminuyó en un 70% con respecto al control (0 mM) (Figura 5). Se determinó entonces que la concentración inhibitoria mínima de H_2O_2 que reduce de forma importante el crecimiento de *C. albicans* es de 0,1 mM.

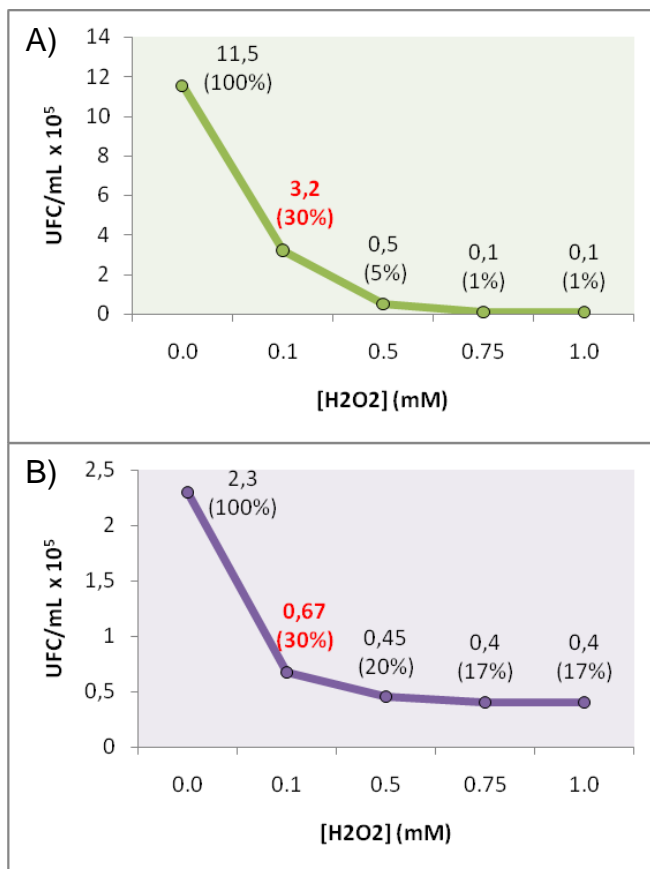


Figura 5: Sobrevivencia de *C. albicans* en test de CIM de H_2O_2 . En ambos gráficos se aprecia el recuento de UFC/ml con su respectivo porcentaje de sobrevivencia (que se encuentra entre paréntesis).

(A) A 0,1 mM la sobrevivencia de *C. albicans* 90029 se redujo a un 30 %.

(B) A 0,1 mM, la sobrevivencia de *C. albicans* P1-1 se redujo a un 30 %.

Ambas cepas de la levadura fueron incubadas durante 48 h a 37° C en condiciones de aerobiosis.

Objetivo 3: Producción de H_2O_2 de *S. sanguinis* en cultivo líquido.

Debido a que los efectos del H_2O_2 están vinculados a su concentración en el medio, se calculó la cantidad de dicho metabolito producido por *S. sanguinis*, la

cual alcanzó una media de $0,059 \pm 6 \times 10^{-4} \mu\text{M}$. Por ende, fue prácticamente uniforme a lo largo de toda la curva de crecimiento (Figura 6).

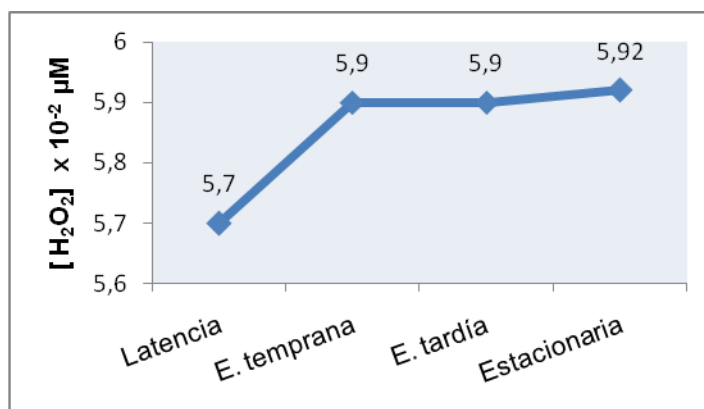


Figura 6: Producción de H₂O₂ de *S. sanguinis* en las distintas etapas de su curva de crecimiento (Latencia, Exponencial temprana (E. temprana), Exponencial tardía (E. tardía) y Estacionaria). La media aritmética de las 4 etapas de la curva de crecimiento bacteriano fue de $5,9 \times 10^{-2} \pm 6 \times 10^{-4} \mu\text{M}$. Cantidad estimada al extrapolar el dato de D.O. en la curva de calibración diseñada previamente.

Objetivo 4: Expresión del gen *SAP2* en *C. albicans* al cultivarla en presencia de la MIC de H₂O₂.

Una vez definida la CIM, la cual fue de 0,1 mM, se realizaron curvas de crecimiento para ambas cepas de *C. albicans*, en medio SD líquido suplementado con 0 (control); 0,1 y 0,5 mM de H₂O₂. Posteriormente, las mediciones de D.O._{600nm} fueron realizadas durante la progresión de la curva de crecimiento.

No hubo diferencias significativas del crecimiento de *C. albicans* entre el control y las distintas concentraciones de H₂O₂ (Figura 7A).

Según los resultados obtenidos en el test de CIM de H₂O₂ para *C. albicans* en medio SD sólido, se esperaba que la curva de crecimiento con 0,1 mM de H₂O₂ estuviera por debajo de la curva control, con una evidente reducción de crecimiento; y que la curva de crecimiento con 0,5 mM de H₂O₂ fuera una línea

aproximadamente paralela al eje X (Figura 7B). Debido a lo anterior, no se realizó el análisis transcripcional del gen *SAP2* de la levadura *C. albicans*. En el ítem Discusión se analizará el porqué de este resultado.

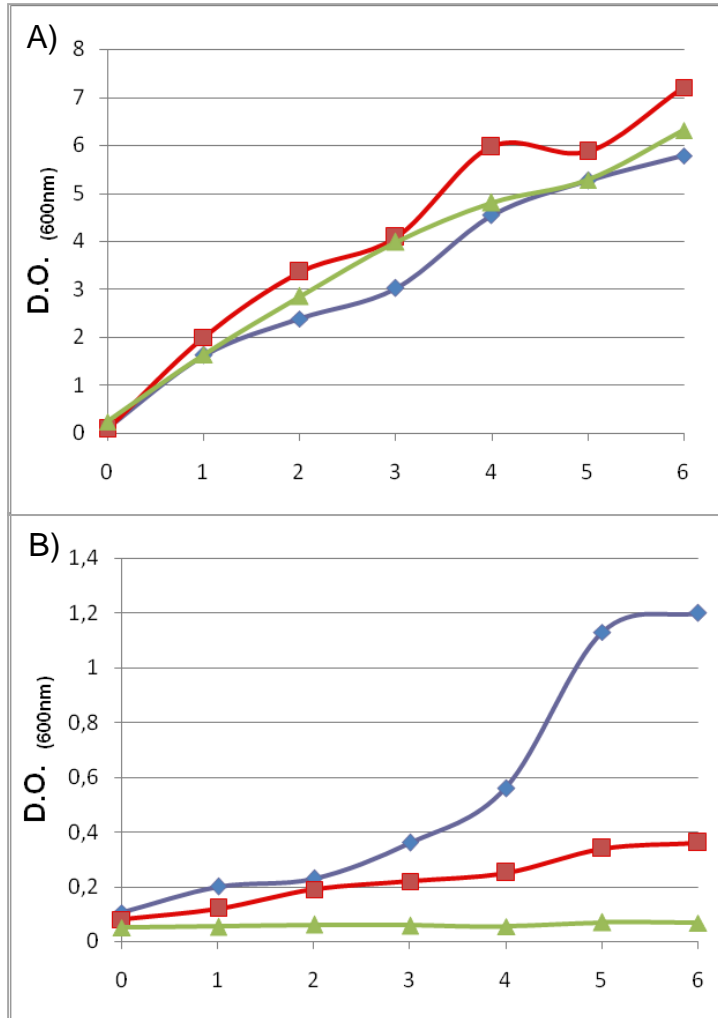


Figura 7: Curvas de crecimiento de *C. albicans* en medio SD líquido en presencia de 0 mM (control, curva azul), 0,1 mM (curva roja) y 0,5 mM (curva verde) de H₂O₂.

(A) Curvas de crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 obtenida en este estudio. Esta levadura fue incubada en condiciones de aerobiosis a 37 °C con agitación. Para medir la D.O. se tomaron 7 puntos (tiempos 0-6 en gráfico), con intervalos de 4 h aprox. entre cada uno de ellos, que describen el crecimiento de la levadura. Punto "0" corresponde al inicio de la curva de crecimiento. Datos corresponden a la mediana de 3 experimentos independientes.

(B) Curvas de crecimiento "esperadas" de *C. albicans*.

DISCUSIÓN:

Diversas investigaciones describen interacciones *Candida*-bacteria dentro de la biopelícula de la cavidad oral. Relaciones de mutualismo han sido previamente reportadas entre *C. albicans* y ciertas especies de *Streptococcus* (Diaz y cols., 2014; Ricker y cols., 2014; Xu y cols., 2014; Cavalcanti y cols., 2015). Por otro lado, hay estudios que han mostrado relaciones antagónicas, por ejemplo, entre *C. albicans* y algunas especies de *Lactobacillus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Juárez y cols., 2011; Méar y cols., 2013), sin embargo, los mecanismos específicos implicados en dichas interacciones no han sido dilucidados completamente hasta la fecha.

Por otra parte, se ha descrito que durante las etapas iniciales del desarrollo de una biopelícula, el H_2O_2 producido por ciertos streptococci causa la selección de los microorganismos que han logrado adaptarse a dicho metabolito (Kreth y cols., 2009). Por lo anterior, el H_2O_2 es considerado un importante mecanismo de protección para los integrantes de la biopelícula inicial contra las especies competidoras. Además, el H_2O_2 produce liberación, por parte de los streptococci que la producen (como por ejemplo *S. sanguinis* y *S. gordonii*), de ADN extracelular (ADNe), un componente importante de la MEC de las biopelículas que contribuye a la adhesión célula-célula (Kreth y cols., 2009). Ensayos *in vitro* de Zheng y cols. (2011) muestran que en cultivos de *S. sanguinis*, la producción de H_2O_2 dependiente de Pox está relacionada con la muerte celular del 10% de la población de dicha bacteria y con la liberación de ADNe al medio. Adicionalmente, el H_2O_2 puede causar daños y modificaciones al ADN liberado, generando mutaciones beneficiosas en diversos casos para los microorganismos que logren incorporar dichas cadenas de ADN a su material genético, promoviendo también la evolución y desarrollo de la biopelícula.

Desde el punto de vista de los streptococci, una vez que la biopelícula ha madurado, la relevancia del H_2O_2 decae, debido a que ya se han generado asociaciones compatibles entre los distintos microorganismos vecinos, además el

grosor de la biopelícula madura dificulta el acceso del oxígeno a determinadas zonas (Zhu y Kreth, 2012).

A pesar del vasto conocimiento acerca del H_2O_2 en la biopelícula dental, su relación en el crecimiento de levaduras dentro de la cavidad oral no ha sido comprendido en su totalidad. Estudios de Abegg y cols. (2012) muestran que en *C. albicans*, el H_2O_2 es capaz de disminuir significativamente los niveles de glutatión, considerada la molécula intracelular con el efecto antioxidante más importante, sin embargo, esta disminución no tuvo correlación con los valores finales de capacidad antioxidante total en la levadura.

Es por lo mencionado anteriormente, que el objetivo de este estudio fue determinar de forma preliminar si la bacteria oral *S. sanguinis*, mediante la producción de H_2O_2 , uno de sus principales factores de virulencia, es capaz de inhibir en algún grado el crecimiento de *C. albicans*. Así, de este modo la bacteria podría mantener los recuentos y/o las características comensales de la levadura en condiciones compatibles con salud oral.

Los resultados de este estudio muestran que, en los ensayos de competencia en medio sólido, fue *C. albicans* quién finalmente generó una disminución del crecimiento (aunque leve) de *S. sanguinis*. Además, en medio líquido, la presencia de *S. sanguinis* al parecer favoreció el crecimiento de *C. albicans*. En base a lo anterior, se rechaza la hipótesis N°1 planteada en este trabajo.

Existen diversas explicaciones para los resultados obtenidos. Cavalcanti y cols. (2015), observaron una mayor virulencia y expresión de hifas por parte de *C. albicans* al ser cultivada en biopelículas mixtas (en donde además de *S. sanguinis*, se encontraban presentes *S. mutans*, *Actinomyces odontolyticus* y *Actinomyces viscosus*), esto en superficies acrílicas y en Epitelio Humano Reconstituido (RHOE). Asimismo, Cavalcanti y cols. (2016) hallaron que, en superficies de titanio, *C. albicans* sobreexpresó los genes *ALS3*, *HWP1*, *SAP2* y mostró mayor formación de hifas en biopelículas con *S. mutans*, *S. sanguinis* y *P.*

gingivalis. No hay, sin embargo, estudios previos con biopelículas mixtas de *C. albicans* únicamente con *S. sanguinis*, que puedan determinar si esta bacteria es capaz de mantener los recuentos de la levadura en niveles compatibles con salud oral y, tampoco se ha descrito como responde la bacteria frente a la presencia de esta levadura.

La cantidad de H_2O_2 producida por *S. sanguinis* fue menor a la concentración inhibitoria mínima determinada para *C. albicans*. Rinnerthaler y cols. (2012) aseveran que el H_2O_2 , a pesar de tener efectos citotóxicos en células fúngicas, cuando se encuentra en bajas concentraciones, podría actuar en ellas como segundo mensajero, promoviendo su crecimiento y desarrollo. Del mismo modo, Bamford y cols. (2009) postulan que el H_2O_2 producido por *S. gordonii*, influencia la morfogénesis y producción de farnesol por *C. albicans*. Esto podría explicar el aumento en los recuentos de *C. albicans* al ser co-cultivada con *S. sanguinis*.

El H_2O_2 es un sub-producto del crecimiento aeróbico de *S. sanguinis*, por lo tanto, su producción en el inicio de la formación de la biopelícula dental está directamente relacionada con la presencia de oxígeno en el microambiente. Kreth y cols. (2008) observaron que *S. sanguinis* y *S. gordonii* inhibieron el crecimiento de *S. mutans* bajo condiciones aeróbicas, más no en condiciones anaeróbicas, en donde *S. mutans* fue quién inhibió el crecimiento de *S. sanguinis* y *S. gordonii*. Además, *S. sanguinis* es capaz de secretar proteínas extracelulares que tienen efectos inhibitorios sobre *C. albicans*, no obstante, se ha descrito que en condiciones de anaerobiosis, estas proteínas son acumuladas dentro de la célula y no son liberadas al espacio extracelular (Ma y cols., 2014). Cabe destacar que, *C. albicans* tiene la capacidad de crecer en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas (Bamford y cols., 2009), por lo que no es un aerobio estricto.

En este trabajo, los ensayos de competencia tanto en medio sólido como en medio líquido fueron realizados en condiciones de microaerofilia (aprox. 5-10 % de oxígeno), con agitación. Dichas condiciones quizás generaron niveles de H_2O_2 que le permitieron a *C. albicans* activar la transcripción de sus sistemas antioxidantes,

para así descomponer esta molécula en productos metabólicos inocuos para ella (Da Silva y cols., 2015). Como consecuencia, la levadura pudo mantenerse y desarrollarse en un ambiente con bajos niveles de H_2O_2 , que incluso podrían ser favorables para ella. Por otro lado, en medio sólido se pudo apreciar la presencia de un leve halo de inhibición próximo al crecimiento de *S. sanguinis* producido por la cercanía de crecimiento de *C. albicans*, en contraste con lo que ocurre en medio líquido, donde la bacteria, al igual que la levadura, aumenta su recuento en los cultivos mixtos en comparación a los cultivos individuales. Al parecer la expresión de los factores de virulencia de *C. albicans* tuvieron mayor efectividad contra el desarrollo de *S. sanguinis* en un medio de cultivo más estático y en microaerofilia.

Respecto de las dos condiciones de cultivo mencionadas anteriormente, este estudio presenta ciertas similitudes con lo ocurrido en patologías orales como la enfermedad periodontal y la caries dental en sus etapas más avanzadas, donde dichas biopelículas maduras, presentan un espesor tal que las aísla del oxígeno disponible en la boca y de la acción limpiadora del flujo salival (haciéndolo más estático). Se sugiere entonces que dichas condiciones podrían dificultar la acción de ciertos factores de virulencia (como el H_2O_2) secretados por algunos colonizadores tempranos (como *S. sanguinis*), y favorecer los de determinados colonizadores tardíos (como *C. albicans* o *S. mutans*), perpetuándose así dicho estado patológico.

En los cultivos individuales, se pudo observar un descenso en el recuento de bacteriano (*S. sanguinis* y *S. mutans*) entre las 24 y 48 h. Caso contrario ocurre con las levaduras, que aumentan su crecimiento en el mismo transcurso de tiempo. Lo anterior se justifica en el hecho de que las bacterias, al ser células procariontes, tienen una velocidad de replicación más rápida que las levaduras, lo que hace que agoten más rápidamente los nutrientes presentes en sus respectivos medios de cultivo. Esto pudo haber influido también en el mayor descenso de las bacterias a las 48 h.

Diversos estudios hablan de *C. albicans* como un hongo capaz de favorecer el inicio y la progresión de la caries dental, teniendo en este aspecto una relación sinérgica con *S. mutans* (Bowen y Koo, 2011; Falsetta y cols., 2014; Gregoire y cols., 2011; Jin y cols., 2004; Klinke y cols., 2009; Morales y Hogan, 2010). Resultados contrastantes se han obtenido en el estudio *in vitro* de Willems y cols. (2016) y en el presente estudio, en donde en medio líquido, estos apuntan hacia una relación de competencia entre estos microorganismos, donde el crecimiento de ambas cepas de *C. albicans* disminuye en presencia de *S. mutans*, sobre todo al ser cultivada como competidora (es decir, 24 h después de la bacteria). Por otro lado, en medio sólido, las levaduras fueron quienes generaron la inhibición del crecimiento en las bacterias.

Con respecto a la medición del pH en los ensayos de inhibición de crecimiento en medio líquido, cabe recordar que actualmente, *C. albicans* es considerada una levadura acidogénica y acidúrica (Falsetta y cols., 2014). No obstante, en este estudio, en comparación al pH inicial del medio (7,8), los cultivos individuales de ambas cepas de *C. albicans* y de *S. sanguinis* provocaron siempre una alcalinización del medio, a excepción de *S. mutans*, que si bien mantuvo el pH en niveles básicos, este se acidificó. Del mismo modo, los co-cultivos muestran que, a excepción del co-cultivo de *S. mutans* (como colonizador), con *C. albicans* 90029 (como competidor), todas las mediciones de pH del medio (*S. sanguinis* con *C. albicans* 90029 o P1-1 y *S. mutans* con *C. albicans* 90020 o P1-1) se incrementaron. Lo anterior sugiere que *C. albicans* podría contribuir en la disminución de la acidez de las biopelículas en donde se encuentra *S. mutans*, disminuyendo su potencial cariogénico.

Resultados similares obtuvieron Willems y cols. (2016), quienes mediante estudios *in vitro* muestran también un rol alcalinizador de *C. albicans* en biopelículas duales con *S. mutans*, además de una menor liberación de calcio al medio cuando la levadura se encontraba presente. *C. albicans* tiene la capacidad de metabolizar azúcares como la glucosa, no obstante, al carecer de la enzima lactato deshidrogenasa, uno de los principales productos finales del metabolismo

de este azúcar en la levadura no es ácido láctico sino que etanol, el cual no ha mostrado generar variaciones en el pH del medio (revisado en Willems y cols. (2016)). Además, *S. mutans*, al ser una bacteria altamente sacarolítica, consume rápidamente la glucosa disponible, formando ácido láctico, forzando a *C. albicans* a utilizar este metabolito como fuente alternativa de carbono, disminuyendo su concentración en el medio y por ende la disminución de la acidez (Willems y cols., 2016). Esto podría explicar el aumento del pH producido por *C. albicans* en co-cultivos mixtos con *S. mutans*, además del menor crecimiento fúngico al ser inoculado como competidor.

Los cultivos de *S. sanguinis* de manera aislada y en forma dual con *C. albicans* también mostraron una alcalinización del medio. Esto podría explicarse por la capacidad de la bacteria de metabolizar la arginina disponible para producir compuestos alcalinos (amoníaco) mediante el sistema enzimático de la Arginina deiminasa (ADS) (Burne y Marquis, 2000). Nascimento y cols. (2013) describen que biopelículas provenientes de dientes libres de caries de niños entre 2 y 14 años, presentaron una actividad ADS significativamente mayor que las muestras obtenidas de dientes con caries (ICDAS II= 3 y 4). La arginina se encuentra principalmente en la saliva y formando parte de las proteínas salivales (con las cuales no se trabajó en este estudio) (Burne y Marquis, 2000). La presencia de este aminoácido en el medio de cultivo utilizado (23,1 g/L de fuente proteica, según datos del fabricante) podría explicar la alcalinización que provocó *S. sanguinis* al cultivarse tanto de forma individual como en co-cultivo con *S. mutans* o *C. albicans*.

Los cultivos duales de *C. albicans* con *S. sanguinis* muestran que, en general, ambos microorganismos aumentan su crecimiento. Además, el crecimiento de la levadura es mayor cuando es co-cultivado con *S. sanguinis* que con *S. mutans*, tanto al ser sembrados simultáneamente como de manera diferida. Se propone entonces que un ambiente más alcalino favorecería el crecimiento de *C. albicans* y de *S. sanguinis*, quienes podrían trabajar de forma sinérgica en la alcalinización de la biopelícula en donde habitan, mediante el consumo de ácido láctico y la

activación del sistema enzimático ADS, respectivamente, haciendo menos susceptible a los dientes a los procesos de demineralización causados por la acidez permanente en la condición de caries dental.

En cuanto a la cantidad de H_2O_2 que produce *S. sanguinis*, múltiples artículos científicos han descrito que en cultivos líquidos y en modelos de biopelícula, esta bacteria produciría entre 0,1 y 4 mM de este compuesto antimicrobiano. Dichas cantidades son superiores a las obtenidas en este estudio (0,059 μ M), donde además se determinó que la CIM de H_2O_2 para *C. albicans* era de 0,1 mM. Es pertinente continuar evaluando en futuras investigaciones si existe un efecto del H_2O_2 en el crecimiento de la levadura y a qué concentración comenzaría tal efecto. El hecho de que el H_2O_2 tenga un efecto obvio en el crecimiento de *C. albicans* es dudoso, debido a que esta levadura presenta varios mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo, los cuales ya se describieron en el ítem marco teórico.

Al comparar el crecimiento de la cepa de referencia con el aislado clínico de la levadura entre sí, se obtiene que, en general, *C. albicans* P1-1 mostró un mayor crecimiento al ser co-cultivado con *S. sanguinis* y sobre todo con *S. mutans*. Por otro lado, *S. mutans* evidenció un mayor crecimiento al co-cultivarse con el aislado clínico que con la cepa de referencia de levadura, a pesar de que el co-cultivo de *S. mutans* con dicho aislado clínico manifestara un descenso en el crecimiento de la bacteria al ser inoculados simultáneamente entre las 24 y 48 h.

Cabe recordar que *C. albicans* P1-1 fue aislada desde saliva de un niño con caries activas. Se sugiere entonces que el haber estado expuesta previamente a una biopelícula cariogénica durante un determinado período de tiempo, podría haber activado en la levadura ciertos mecanismos o rutas metabólicas (explicadas previamente en la discusión) que le permitieron competir de mejor manera con *S. sanguinis* y *S. mutans*, además de favorecer el crecimiento de ambas bacterias, mayoritariamente de *S. mutans*, que consecuentemente es una bacteria con un rol cariogénico ampliamente estudiado. En términos del proceso de caries, este

resultado es contrastante respecto del efecto de *C. albicans* en el pH obtenido en este mismo estudio. La amplia versatilidad de *C. albicans* debido a las variaciones morfológicas que puede adoptar, las múltiples interacciones microbiológicas, mecanismos de defensa y moléculas que secreta, quizás le permiten desarrollarse y adaptarse de manera óptima, tanto en una biopelícula cariogénica, como en una compatible con salud oral.

Con respecto al objetivo 4, no se realizó el análisis de la expresión del gen *SAP2* de *C. albicans*, quedando la hipótesis N°2 de este trabajo sin posibilidad de ser corroborada. Lo anterior se debió a que las curvas de crecimiento de la levadura, suplementadas con la concentración inhibitoria mínima de H_2O_2 (0,1 mM) y con una concentración por sobre esta última (0,5 mM) no describieron el comportamiento esperado mostrado en la figura 7B. Preliminarmente, se esperaba que la levadura describiera tal comportamiento, de manera similar a lo observado en el test de CIM realizado en el presente estudio y como lo ha sido frente a distintos agentes con fines farmacéuticos. Esto puede explicarse como se mencionó anteriormente, que los niveles (bajos) producidos de H_2O_2 por *S. sanguinis*, fueron suficientes para permitir a *C. albicans* activar la transcripción de sus sistemas antioxidantes, de este modo la levadura pudo mantenerse en este ambiente.

Ahora bien, se ha reportado que *C. albicans* produce tres moléculas involucradas en comunicación célula-célula y que estarían involucradas en resistencia a estrés oxidativo, una de ellas es Farnesol. Esta molécula se acumula durante la proliferación celular en el medio de cultivo e intracelularmente desencadena una cascada de transducción de señales en la célula activando una respuesta general de estrés, aunque todavía no están descritos todos los intermediarios participantes. De esta manera se especula que farnesol podría de manera indirecta estimular la sobrevivencia celular como respuesta a estrés (revisado en Westwater y cols. (2005); Willems y cols., 2016). Frente a lo anterior, se propone realizar las curvas de crecimiento con las concentraciones indicadas en la metodología y medir no solo la expresión del gen *SAP2* (que probablemente se

encuentren diferencias), sino también determinar la concentración de farnesol presente en el medio de cultivo y la concentración de H₂O₂. Se espera que la relación entre estos dos compuestos sea inversamente proporcional, es decir, a medida que el H₂O₂ se descompone se observe una acumulación de farnesol hacia las fases más tardías de crecimiento. Estos resultados podrían ampliar el conocimiento acerca de la interacción entre *S. sanguinis* y *C. albicans* en la cavidad oral, además del rol de esta última dentro de la biopelícula dental.

Finalmente, los resultados de este estudio podrían aportar, de forma preliminar, una posible nueva visión del rol de *C. albicans* en el contexto de la caries dental, y también de sus interacciones con los colonizadores tempranos, específicamente con *S. sanguinis*. Sin embargo, para poder obtener resultados con mayor peso estadístico, es indispensable la replicación de los experimentos con un número de ensayos de co-cultivo mayor para cada grupo. Además, se sugiere realizar dichos experimentos utilizando modelos validados de caries *in vitro* con el fin de formar biopelículas duales entre los microorganismos estudiados, a modo de estudiar en condiciones más similares al ambiente bucal si, por una parte, el efecto de *S. sanguinis* en *C. albicans* es similar al obtenido en este estudio y, por otra parte, para verificar si *C. albicans* contribuye en disminuir la acidez del medio, y si esa disminución es más relevante, dentro del contexto de la patogénesis de la caries dental, que la asociación positiva que hasta la fecha se le atribuye con ciertas bacterias cariogénicas, como *S. mutans*.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y a las limitaciones del estudio, se puede concluir que:

S. sanguinis no inhibe el crecimiento de *C. albicans*. Asimismo, ambos podrían contribuir en mantener el pH del microambiente en niveles compatibles con salud oral.

El H₂O₂ podría influir negativamente en el crecimiento de *C. albicans*, no obstante, este efecto estaría supeditado a su concentración en el medio.

Interesantemente, el co-cultivo de *C. albicans* con *S. mutans* podría beneficiar el crecimiento de la bacteria, en desmedro de la levadura. Sin embargo, cuando la levadura proviene de una biopelícula cariogénica, su relación con la bacteria podría tornarse más sinérgica. Entonces, el rol de *C. albicans* dentro del proceso de caries podría depender de la condición que presenta el microambiente, previo a la presencia de la levadura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abegg M., Alabarse P., Schüller A., Benfato M. (2012). Glutathione levels in and total antioxidant capacity of *Candida sp.* cells exposed to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 620-626.
- Baldeck J., Marquis R. (2008). Targets for hydrogen-peroxide-induced damage to suspension and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol* 54: 868-875.
- Bamford C., D'Mello A., Nobbs A., Dutton L., Vickerman M., Jenkinson H. (2009). *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect Immun* 77: 3696-3704.
- Bastidas R., Heitman J. (2009). Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. *P Natl Acad Sci* 106: 351-352.
- Becker M., Paster B., Leys E., Moeschberger M., Kenyon S., Galvin J., Boches S., Dewhirst F., Griffen A. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40: 1001-1009.
- Berman J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 9: 595-601.
- Brown G. (2011). Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol* 29: 1-21.
- Bowen W., Koo H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 45: 69-86.
- Burne R., Marquis R. (2000). Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 193:1-6.
- Buscher J., Van der Meri H. (2000). Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. *Soc Gen Microbiol* 59: 25-36.
- Cavalcanti Y., Morse D., Da Silva W., Del-Bel-Cury A., Wei X., Wilson M., Milward P., Lewis M., Bradshaw D., Williams D. (2015). Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling* 31: 27-38.
- Cavalcanti Y., Wilson M., Lewis M., Del-Bel-Cury A., da Silva W., Williams D. (2016). Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling* 32: 123-134.

- Cephas K., Kim J., Mathai R., Barry K., Dowd S., Meline B., Swanson K. (2011). Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. *PloS One* 6: e23503.
- Daep C., Lamont R., Demuth D. (2008). Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with oral streptococci requires a motif that resembles the eukaryotic nuclear receptor box protein-protein interaction domain. *Infect Immun* 76: 3273-3280.
- Da Silva A., Day A., Ikeh M., Kos I., Achan B., Quinn J. (2015). Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomol* 5:142-165.
- De Carvalho F., Silva D., Hebling J., Spolidorio L., Spolidorio D. (2006). Presence of *mutans streptococci* and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol* 51: 1024-1028.
- Diaz P., Strausbaugh L., Dongari-Bagtzoglou A. (2014). Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 101-107.
- Douglas L. (2002). Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 19: 139-143.
- Edelstein B. (2006). The dental caries pandemic and disparities problem. *BMC Oral Health* 6 Suppl 1:S2.
- Falsetta M., Klein M., Colonne P., Scott-Anne K., Gregoire S., Pai C., Gonzalez M., Watson G., Krysan D., Bowen W., Koo H. (2014). Synergizes the virulence of plaque-biofilms *in vivo*. *Infect Immun* 10: 087-114.
- Featherstone J. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J* 53: 286-291.
- Fejerskov O. (2004). Changing paradigms in concepts of dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 38: 182-191.
- Ferreira-Nóbilo N., Tabchoury C., De Sousa M., Cury J. (2015). Knowledge of dental caries and salivary factors related to the disease: influence of the teaching-learning process. *Braz Oral Res* 29 pii: S1806-83242015000100258.
- Ge Y., Caufield P., Fisch G., Li Y. (2008). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res* 42: 444-448.
- Ge X., Shi X., Shi L., Liu J., Stone V., Kong F., Kitten T., Xu P. (2016). Involvement of NADH oxidase in biofilm formation in *Streptococcus sanguinis*. *PLoS One* 11: e0151142.

- Gilliland SE (1968). Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide in milk. *J Dairy Science* 52: 321-324.
- Gow N., Van de Veerdonk F., Brown A., Netea M. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 10: 112-122.
- Gregoire S., Xiao J., Silva B., Gonzalez I., Agidi P., Klein M., Ambatipudi K., Rosalen P., Bauserman R., Waugh R., Koo H. (2011). Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol* 77: 6357-6367.
- Hall-Stoodley L., Stoodley P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11: 1034-1043.
- Hannig C., Hannig M., Attin T. (2005). Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113: 2-13.
- Harriott M., Noverr M. (2010). Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3746-3755.
- Harriott M., Noverr M. (2011). Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Cell Rev Trends in Microbiol* 19: 557-563.
- HOMD. Oral human microbiome database. Disponible en: <http://www.homd.org/>
- Islam B., Khan S., Khan A. (2007). Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit* 13: 196-203.
- Jenkinson H., Douglas L. Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections. En Brogden K., Guthmiller J. (2002). *Polymicrobial Diseases* Washington (DC): ASM Press 10: 357-373.
- Jin Y., Samaranayake L., Samaranayake Y., Yip H. (2004). Biofilmformation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol* 49: 789-798.
- Juárez M., Saralegui C., De Gregorio P., Vera E., Nader M. (2011). Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 159: 399-406.
- Kerrigan S., Jakubovics N., Keane C., Maguire P., Wynne K., Jenkinson H., Cox D. (2007). Role of *Streptococcus gordonii* surface proteins SspA/SspB and Hsa in platelet function. *Infect Immun* 75: 5740-5747.

Klinke T., Kneist S., De Soet j., Kuhlisch E., Mauersberger S., Förster A., Klimm W. (2009). Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res* 43: 83-91.

Koelsch G., Tang J., Loy J., Monod M., Jackson K., Foundling S., Lin X. (2000). Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1480: 117-131.

Komalapriya C., Kaloriti D., Tillmann A., Yin Z., Herrero-de-Dios C., Jacobsen M., Belmonte R., Cameron G., Haynes K., Grebogi C., De Moura A., Gow N., Thiel M., Quinn J., Brown A., Romano M. (2015). Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS One* 14: e0137750.

Kreth J., Merritt J., Shi W., Qi F. (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 187: 7193-7203.

Kreth J., Zhang Y., Herzberg M. (2008). Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interfere with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 190: 4632-4640.

Kreth J., Vu H., Zhang Y., Herzberg M. (2009). Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol* 191: 6281-6291.

Kreth J., Merritt J., Qi F. (2009). Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA Cell Biol* 28: 397-403.

Krom B., Kidwai S., Ten Cate J. (2014). *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res* 93: 445-451.

Kuramitsu H., He X., Lux R., Anderson M., Shi W. (2007). Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 653-670.

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 Res* 9: 1102-1110.

Li W., Yu D., Gao S., Lin J., Chen Z., Zhao W. (2014). Role of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases (Saps) in severe early childhood caries. *Int J Mol Sci* 15: 10766-10779.

Livak K., Schmittgen T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$). *Method Meth* 25: 402-408.

Ma S., Li H., Yan C., Wang D., Li H., Xia X., Dong X., Zhao Y., Sun T., Hu P., Guan W. (2014). Antagonistic effect of protein extracts from *Streptococcus*

sanguinis on pathogenic bacteria and fungi of the oral cavity. *Exp Ther Med* 7: 1486-1494.

Marsh P., Bradshaw D. (1999). Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43: 599-614.

Marsh P. (2005). Dental plaque biological significance of a biofilm and community life style. *J Clin Periodontol* 32: 7-15.

Méar J., Kipnis E., Faure E., Dessein R., Schurtz G., Faure K., Guery B. (2013). *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: more than an opportunistic criminal association?. *Med Mal Infect* 43: 146-151.

Morales D., Hogan D. (2010). *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog* 6: e1000886.

Naglik J., Newport G., White T., Fernandes-Naglik L., Greenspan J., Greenspan D., Sweet S. (1999). *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect and Immun* 67: 2482-2490.

Naglik J., Challacombe S., Hube B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-428.

Nascimento M., Liu Y., Kalra R., Perry S., Adewumi A., Xu X., Primosch R., Burne R. (2013). Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *J Dent Res* 92: 604-608.

Nasidze I., Li J., Quinque D., Tang K., Stoneking M. (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 19: 636-643.

Nasution O., Srinivasa K., Kim M., Kim YJ., Kim W., Jeong W., Choi W. (2008). Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 7: 2008-2011.

Nikawa H., Yamashiro H., Makihira S., Nishimura M., Egusa H., Furukawa M. Setijanto D., Hamada T. (2003). *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 46: 471-478.

Nobbs A., Lamont R., Jenkinson H. (2009). *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 407-450.

Nobbs A., Vickerman M., Jenkinson H. (2010). Heterologous expression of *Candida albicans* cell wall-associated adhesins in *Saccharomyces cerevisiae* reveals differential specificities in adherence and biofilm formation and in binding oral *Streptococcus gordonii*. *Eukaryotic Cell* 9: 1622-1634.

Nobbs A., Zhang Y., Khammanivong A., Herzberg M. (2007). *Streptococcus gordonii* Hsa environmentally constrains competitive binding by *Streptococcus sanguinis* to saliva-coated hydroxyapatite. *J Bacteriol* 189: 3106-3114.

Peleg A., Hogan D., Mylonakis E. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol* 8: 340-349.

Perlroth J., Choi B., Spellberg B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45: 321-46.

Peters B. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 493-503.

Pfaller M., Diekema D. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-163.

Petersen P. (2004). Challenges to improvement of oral health in the 21st century the approach of the WHO global oral health programme. *Int Dent J* 54: 329-343

Podbielski A., Kreikemeyer B. (2004). Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis* 8: 81-95.

Raja M., Hannan A., Ali K. (2010). Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res* 44: 272-276.

Ramadan H., Sanclement J., Thomas J. (2005). Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 414-417.

Ramos-Montañez S., Tsui H., Wayne K., Morris J., Peters L., Zhang F., Kazmierczak K., Sham L., Winkler M. (2008). Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 67: 729-746.

Ricker A., Vickerman M., Dongari-Bagtzoglou A. (2014). *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase promotes biofilm interactions with *Candida albicans*. *J Oral Microbiol* 6: 23419-23429.

Rinnerthaler M., Büttner S., Laun P., Heeren G., Felder T., Klinger H., Martin Weinberger M., Stolze K., Grousl T., Hasek J., Benada O., Frydlova I., Klocker A., Simon-Nobbe B., Jansko B., Breitenbach-Koller H., Eisenberg T., Gourlay C., Madeo F., Burhans W., Breitenbach M. (2012). Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc Natl Acad Sci* 109: 8658-8663.

- Samaranayake L., Cheung L., Samaranayake Y. (2002). Candidiasis and other fungal diseases of the mouth. *Dermatol Ther* 15: 252-270.
- Schulze J., Sonnenborn U. (2009). Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int* 106: 837-42.
- Scully C., Greenman J. (2008). Halitosis (breath odor). *Periodontol* 48: 66-75.
- Shirtliff M., Peters B., Jabra-Rizk M. (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 299: 1-8.
- Simón-Soro A., Mira A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiol* 23: 76-82.
- Simón-Soro A., Belda-Ferre P., Cabrera-Rubio R., Alcaraz L., Mira A. (2013). A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res* 47: 591-600.
- Soll D. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* 81: 101-110.
- Struzycka I. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol* 63: 127-135.
- Tittmann K., Wille G., Golbik R., Weidner A., Ghisla S., Hubner G. (2005). Radical phosphate transfer mechanism for the thiamin diphosphate- and FAD-dependent pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. Kinetic coupling of intercofactor electron transfer with phosphate transfer to acetyl-thiamin diphosphate via a transient FAD semiquinone/hydroxyethyl-ThDP radical pair. *Biochemistry* 44: 13291-13303.
- Trofa D., Gácsér A., Nosanchuk J. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 606-662.
- Uehara Y., Agematsu K., Kikuchi K., Matsuzaki S., Imai S., Takamoto M., Sugane K., Sugiura T., Konishi Y. (2006). Secretory IgA, salivary peroxidase, and catalase-mediated microbicidal activity during hydrogen peroxide catabolism in *viridans streptococci*: pathogen coaggregation. *J Infect Dis* 194: 98-107.
- Westwater C., Balish E., Schofield DA. (2005). *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryotic Cell* 4: 1654-1661.
- Willems M., Kos K., Jabra-Risk M., Krom B. (2016). *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftw039> ftw039.
- Williams D., Kuriyama T., Silva S., Malic S., Lewis M. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 55: 250-265.

Wilson L., Reyes C., Stolpman M., Speckman J., Allen K., Beney J. (2002). The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health* 5: 26-34.

Xu H., Sobue T., Thompson A., Xie Z., Poon K., Ricker A. y cols. (2014). Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell Microbiol* 16: 214-231.

Yang X., Zhang Q., Lu L., Yang R, Liu Y., Zou J. (2012). Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of chinese children associated with severe earlychildhood caries. *Arch Oral Biol* 57: 1048-1053.

Zheng L., Chen Z., Itzek A., Ashby M., Kreth J. (2011). Catabolite control protein A controls hydrogen peroxide production and cell death in *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol* 193: 516-526.

Zhu L., Kreth J. (2010). Role of *Streptococcus mutans* eukaryotic-type serine/threonine protein kinase in interspecies interactions with *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol* 55: 385-390.

Zhu L., Kreth J. (2012). The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 717843.

Zhu L., Xu Y., Ferretti J., Kreth J. (2014). Probing oral microbial functionality-expression of *spxB* in plaque samples. *PLoS One* 9: e86685.