



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

“Producción de autoinductor-2 por *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 y sus efectos en la adhesión y formación de biopelículas”

Pamela García Muñoz

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

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Carla Lozano Moraga

Dr. Alejandro Escobar Álvarez

**Adscrito a Proyecto Fondecyt N° 11150928
Santiago - Chile
2018**



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

“Producción de autoinductor-2 por *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 y sus efectos en la adhesión y formación de biopelículas”

Pamela García Muñoz

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

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Carla Lozano Moraga

Dr. Alejandro Escobar Álvarez

**Adscrito a Proyecto Fondecyt N° 11150928
Santiago - Chile
2018**

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, padre y a toda mi familia por su apoyo incondicional durante toda la carrera, por quererme, cuidarme y ayudarme en todas las etapas y especialmente en los momentos que se volvió más difícil.

A los amigos que conocí en la facultad, Camilo, Caro, Dani, Estefi, Monse, Pedro, Rocío, Ricardo y Vale, por su apoyo, por los momentos que compartimos y seguiremos compartiendo.

Agradecimientos extras a Ricardo, compañero de proyecto.

A todos los profesores que han sido parte de mi formación.

A mis profesores tutores y especialmente a la profesora tutora principal Dra. Claudia Lefimil por su infinito apoyo, paciencia y buena disposición al enseñar y guiarme en este trabajo.

A todos los que conocí trabajando en el laboratorio de bioquímica especialmente la Andreita y la Sari, por su ayuda y compañía.

A todos, mil gracias.

INDICE

1) RESUMEN	7
2) MARCO TEÓRICO	9
Caries dental	9
<i>Bifidobacterium dentium</i>	11
Comunicación bacteriana	14
3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
4) MATERIALES Y MÉTODOS	18
Cepas utilizadas	18
Cultivos microbiológicos	18
Detección de AI-2 producido por <i>B. dentium</i> ATCC 27534	18
Obtención y preparación de saliva humana	19
Ensayos de adherencia	20
Ensayos de formación de biopelículas	21
Análisis estadísticos	21
5) RESULTADOS	22
Crecimiento de <i>B. dentium</i> ATCC 27534	22
Producción de AI-2 por <i>B. dentium</i> ATCC 27534	23
Adhesión de <i>B. dentium</i> ATCC 27534 y efecto de AI-2	24
Formación de biopelículas de <i>B. dentium</i> ATCC 27534 y efecto de AI-2	25
6) DISCUSIÓN	28
7) CONCLUSIONES	32
8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9) ANEXOS Y APÉNDICES	37

1) RESUMEN

Introducción: *Bifidobacterium dentium* es un microorganismo anaeróbico, Gram positivo, acidógeno y acidúrico, que ha sido aislada en la cavidad oral a partir de saliva y lesiones de caries, relacionándose al progreso de la caries dental. Junto a otros microorganismos, *B. dentium* puede formar parte de la biopelícula en la superficie dental, denominada placa dental, donde diferentes especies bacterianas pueden interactuar a través de *quorum sensing*. En algunas bacterias Gram positivo orales, se ha descrito el sistema de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2, el cual es producido por la enzima LuxS. Éste ha demostrado tener un papel en el crecimiento, la formación de biopelículas y la resistencia a los ácidos en esos microorganismos. En *B. dentium*, existe poca información de este sistema. El objetivo de este estudio fue analizar la producción de autoinductor-2 por parte de *B. dentium* ATCC 27534 y los efectos de éste en la adhesión y formación de biopelículas.

Materiales y métodos: la presencia y actividad de AI-2 producido por *B. dentium* ATCC 27534 fue detectada mediante el sistema de ensayo reportero *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1117, utilizando el sobrenadante de cultivos de *B. dentium* ATCC 27534 obtenidos en distintas etapas de crecimiento. El efecto de autoinductor-2 en la adhesión de *B. dentium* ATCC 27534 se analizó en microplacas de poliestireno de 96 pocillos en presencia o ausencia de DPD (autoinductor-2 sintetizado químicamente), utilizando saliva y medio de cultivo, a las 16 horas. La adherencia bacteriana se midió usando el ensayo MTT y un SynergyHT (Biotek®). Finalmente, el ensayo de formación de biopelículas y efecto del DPD se realizó sobre cubreobjetos de vidrio embebidos en saliva, durante 3 y 5 días, bajo las mismas condiciones que el ensayo de adherencia, y se documentó con un microscopio electrónico de barrido (JSM-IT300, JEOL).

Resultados: Se demostró la presencia de autoinductor-2 en el sobrenadante de cultivos de *B. dentium* ATCC 27534, indicando que este microorganismo es capaz de producirlo y secretarlo al medio externo. Se determinó, además, que este microorganismo es capaz de presentar adhesión a superficies sólidas, la que

aumenta significativamente en presencia de autoinductor-2. Junto con esto, la presencia de autoinductor-2 exógeno incrementa la formación de biopelículas, mediante el aumento del número de células adheridas a la superficie, así como se pudo observar un aumento cualitativo de los niveles de exopolisacáridos excretados.

Conclusiones: Los resultados indican que el sistema de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2 es importante para controlar los procesos fisiológicos de adhesión y formación de biopelículas en *B. dentium* ATCC 27534.

Investigaciones adicionales permitirán dilucidar cómo estos microorganismos se comunican entre sí a través de este sistema, así como su participación en la cascada de regulaciones que permiten la permanencia de *B. dentium* en los sitios de caries.

2) MARCO TEÓRICO

Caries dental

La caries dental es una enfermedad crónica de alta prevalencia, definida epidemiológicamente por la Organización Mundial de la Salud como una pandemia (Petersen, 2003). En Chile, el análisis de situación de Salud Bucal realizado el año 2011 por el Ministerio de Salud (MINSAL, 2011), determinó la existencia de una alta prevalencia de esta enfermedad en la población, alcanzando un 70,4% en niños de 6 años, 62,5% a los 12 años y sobre 99% en adultos.

La caries dental es una enfermedad multifactorial, que se manifiesta finalmente en la lesión de caries, desarrollada debido al desbalance en los procesos fisiológicos normales de desmineralización y remineralización de esmalte y dentina, que ocurre debido a frecuentes caídas de pH bajo el punto crítico de desmineralización (pH 5,5) (Dong y cols., 1999). Esta disminución de pH está dada por la presencia de una biopelícula bacteriana en la superficie del diente, conocida como placa bacteriana o placa dental, formada por bacterias acidogénicas (productoras de ácidos) y bacterias acidúricas (capaces de resistir y funcionar a un bajo pH) (Hojo y cols., 2009; Takahashi y Nyvad, 2011).

En condiciones de salud se mantiene una estabilidad dinámica dentro de la biopelícula dental. Los microorganismos presentes en ésta generan ácidos orgánicos como producto de su metabolismo, en presencia de hidratos de carbono, y este ácido es contrarrestado por amortiguadores salivales, impidiendo una pérdida neta de minerales desde las piezas dentarias. Se presenta una relación simbiótica entre microorganismos y hospedero, pero esta relación cambia una vez que las condiciones lo hacen (Takahashi y Nyvad, 2011).

Frente a un consumo regular de hidratos de carbono fermentables, higiene oral deficiente o problemas con el flujo salival, el equilibrio dinámico de pH se ve alterado. La producción constante de ácidos orgánicos induce a la adaptación y la selección de microorganismos acidogénicos y acidúricos, disminuyendo la diversidad de bacterias presentes en la placa dental (Wolff, 2013). Estos microorganismos juegan un papel crítico en desestabilizar la homeostasis de la

biopelícula. La acidificación constante de la placa dental facilita el desbalance de los procesos de desmineralización y remineralización del esmalte, produciendo con el tiempo una pérdida neta de minerales. En este punto, el ambiente ácido ya se ha establecido, promoviendo la enfermedad y el desarrollo de la lesión de caries, así como la prevalencia de ciertas bacterias asociadas a enfermedad (Takahashi y Nyvad, 2011).

Numerosos estudios han identificado a *Streptococcus mutans* como el principal agente etiológico de la caries dental, ya que se localiza en la superficie dentaria y es abundante en la biopelícula en etapas iniciales de lesión, y su virulencia se asocia fuertemente con el consumo de carbohidratos (Tanzer y cols., 2001). Sin embargo, investigaciones recientes revelan que la caries puede desarrollarse aún en su ausencia (Aas y cols., 2008). Otros estudios también revelan que las especies dominantes en la biopelícula dental pueden ser *S. mutans*, especies de *Streptococcus* del tipo no-mutans, *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Veionella* spp. y *Propionibacterium* spp., que complementan o incluso pueden remplazar a *S. mutans* en el proceso patogénico de la caries (Aas y cols., 2008; Hojo y cols., 2009; Takahashi y Nyvad, 2011). Palmer (2014), destaca la importancia de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., que pueden ser tan importantes como *S. mutans* en lesiones de caries, especialmente tomando en cuenta la ausencia de esta última en varias lesiones.

S. mutans se encuentra en lesiones de caries superficiales, pero son menos frecuentes en el frente de avance de la lesión dentinaria, donde *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp., *Atopobium* spp., *Bifidobacterium* spp., y otros, son más prevalentes (Aas y cols., 2008; Kianoush y cols., 2014). Se ha visto que la diversidad de la población microbiológica disminuye a medida que aumenta la profundidad de la lesión, donde el ambiente se torna más ácido y anaerobio, seleccionando a una parte de la microbiota oral con capacidades para sobrevivir a estas condiciones (Preza y cols., 2009; Kianoush y cols., 2014). *Bifidobacterium* spp. ha sido aislado frecuentemente desde sitios de lesiones profundas, indicando que es una de las especies capaces de sobrevivir en este ambiente.

***Bifidobacterium* spp.**

El género *Bifidobacterium*, es miembro de la familia *Bifidobacteriaceae*, perteneciente al *phylum Actinobacteria*. La familia *Bifidobacteriaceae* consta de 7 géneros: *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia*, *Scardovia* y *Alloiscardovia*, los cuales han sido aislados desde fuentes humanas y animales.

Los miembros del género *Bifidobacterium* son microorganismos Gram positivo, polimórficamente ramificados (Figura 1), no móviles y no formadores de esporas, que se encuentran en distintos nichos ecológicos, como intestinos de animales y humanos, cavidad oral, leche materna, y alimentos (Ventura y cols., 2007; Beighton y cols., 2008). También se han aislado de la cavidad oral humana, a partir de saliva y lesiones de caries, relacionándose al progreso de la caries dental (Crociani y cols., 1996; Beighton y cols., 2008; Mantzourani y cols., 2009a,b; Beighton y cols., 2010; Kianoush y cols., 2014).

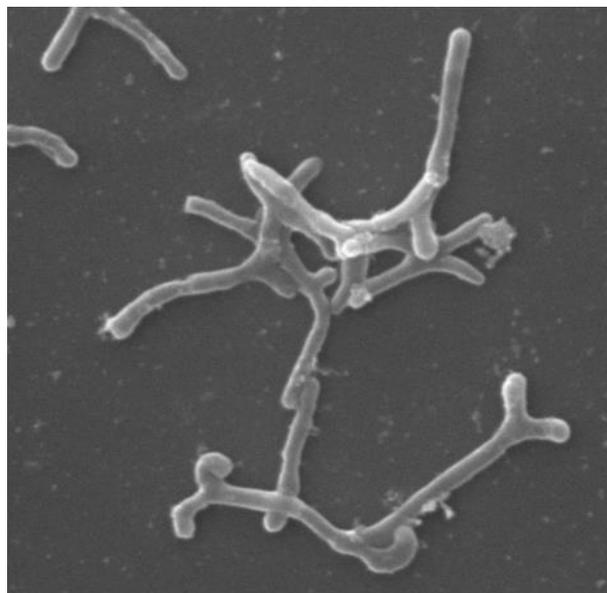


Figura 1. Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido (SEM) de *B. dentium* ATCC 27534 sobre discos de vidrio embebidos con saliva. Magnificación 4500X. Imagen obtenida en esta tesis.

Algunas especies de *Bifidobacterium*, como *B. longum*, *B. lactis*, *B. animalis* y *B. dentium*, son capaces de producir ácido en presencia de glucosa, y disminuir el pH del medio de cultivo por debajo de 4,2 (Haukioja y cols., 2008; Argandoña y cols., 2016). En el análisis genómico de *B. dentium* Bd1, Ventura y cols., (2009), encontraron genes relacionados a factores de virulencia asociados con adhesinas, tolerancia a ambientes ácidos y capacidad de utilizar componentes derivados de saliva, considerados como evidencia de la capacidad de *B. dentium* de colonizar la cavidad oral y proliferar dentro de las lesiones de caries.

Beighton y cols. (2008), estudiaron la presencia de miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* en muestras de saliva y dentina infectada, obteniendo resultados positivos en 94% de las muestras salivales analizadas, alcanzando niveles similares en prevalencia a *S. mutans*. La especie predominante fue *B. dentium* (en 82,2% de sujetos), seguida por *B. longum* (10,8%), *Scardovia inopinata* (4,7%) y *Parascardovia denticolens* (3,2%). *B. dentium* estaba presente en todas las muestras de dentina analizadas.

Beighton y cols. (2010), analizaron la presencia de *Bifidobacterium* spp. en la cavidad oral de adultos mayores de 60 años, y éstas fueron aisladas desde el 96,8% de los participantes con lesiones de caries, siendo *B. dentium* y *B. longum* las especies más prevalentes.

Mantzourani y cols. (2009a) estudiaron las especies de *Bifidobacterium* obtenidas de dentina, en lesiones de caries oclusales activas en dientes permanentes en adultos y dientes deciduos en niños, determinando que *B. dentium* era la especie más frecuentemente aislada. Por otra parte, al analizar muestras de biopelícula de superficies dentales de niños y adultos sin caries, no se logró aislar *Bifidobacterium* spp. Esto podría sugerir un posible papel en el progreso de la lesión. Además, previamente lograron aislar *Bifidobacterium* spp. de todas las muestras de lesiones radiculares y activas, siendo éstas aproximadamente el 8% del total de anaerobios cultivables (Mantzourani y cols., 2009b).

Por otro lado, en un estudio piloto, Henne y cols. (2015) analizaron la actividad bacteriana en biopelículas dentales cariogénicas y sanas, mediante la

determinación de la concentración de ARN ribosomal 16S y del número de ribosomas, considerado un indicador molecular de la actividad metabólica general de las bacterias pues su número se eleva con el aumento de las actividades anabólicas y catabólicas. En este análisis encontraron una mayor actividad de *Bifidobacterium* spp. en muestras de biopelículas provenientes de sitios cavitados que en aquellas muestras obtenidas desde sitios sanos, en pacientes con caries, concluyendo que estos microorganismos se encontrarían mayormente involucrados en lesiones establecidas.

En Chile, en un estudio preliminar en el laboratorio, se analizó a los miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* presentes en la cavidad oral de niños chilenos libres de caries y en niños chilenos con caries profundas (Godoy y cols., 2013, comunicación personal), además de las especies de *Bifidobacterium* presentes en la saliva de adultos libres de caries y con caries profundas (Pérez y cols., 2014, comunicación personal). Las muestras de saliva de niños libres de caries mostraron un recuento de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) de *Bifidobacteriaceae* similar a las muestras de saliva de niños con caries profundas. Sin embargo, en niños y adultos, se obtuvo un recuento alto de *Bifidobacteriaceae* desde las muestras de sitios con lesión. En saliva de niños y adultos con caries profundas y en muestras de sitios con lesión en niños, *B. dentium* fue la especie de *Bifidobacterium* más frecuentemente aislada.

Aunque los distintos estudios no son comparables, ya que difieren en los sujetos de estudio, en el lugar de donde se toma la muestra y en los métodos de análisis, se observa una tendencia común en las especies encontradas en los sitios de caries profunda, siendo *B. dentium* una de las especies comúnmente obtenida. Esto indica que estos microorganismos deben poseer mecanismos adaptativos que les permiten sobrevivir en estas lesiones, donde además coexisten con otras especies ¿Cómo sobreviven e interactúan en este ambiente?

Comunicación bacteriana

La principal forma de comunicación en microorganismos es aquella denominada como *quorum sensing*, en la cual, mediante la producción y detección de químicos extracelulares llamados autoinductores, las bacterias pueden monitorear la cantidad de población celular, lo que les permite responder modificando su expresión genética (Ng y Bassler, 2009). En este proceso, las bacterias secretan los autoinductores hacia el exterior de la célula, el que se acumula en el espacio extracelular, aumentando su concentración. Cuando la concentración de autoinductores llega al umbral requerido para su detección, se activan receptores en las membranas de las bacterias (de la misma o diferente especie), y se produce en ellas una cascada de transducción de señales, responsable de modificar la expresión de genes. De esta forma, el *quorum sensing* influencia un amplio rango de funciones como la virulencia, tolerancia a un ambiente ácido y formación de biopelículas, entre otras (Ng y Bassler, 2009; Wright y cols., 2013). Este tipo de comunicación puede producirse entre cepas bacterianas, especies y géneros.

En bacterias Gram positivo se han descrito dos sistemas principales de *quorum sensing*. El primer sistema descrito es el uso de oligopéptidos modificados como autoinductores codificados genéticamente, que se secretan mediante transportadores de membrana especializados. El receptor afín está unido a la membrana, que transduce la señal a través de una serie de eventos de fosforilación, después de haber sido provocada por la unión de la molécula de autoinductor (Ng y Bassler, 2009).

El segundo sistema de señales implica un conjunto de moléculas interconvertibles, llamado AI-2 (autoinductor-2), originado a partir de 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), que es producido por la enzima LuxS, utilizando S-ribosil-homocisteína (SHR) como sustrato (Pereira y cols., 2013). DPD se cicla espontáneamente formando distintos isómeros en una solución. La primera estructura es una molécula cíclica borada, denominada S-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofuranoborato (S-THMF-borato) y la segunda molécula, corresponde a una estructura no borada, el R-2-metil-2,3,3,4-

tetrahidroxitetrahidrofurano (R-THMF). Ambas moléculas están en equilibrio con DPD, y pueden interconvertirse rápidamente.

Se ha estudiado el rol de AI-2 en el medioambiente oral, en relación al desarrollo de comunidades, colonización, virulencia y crecimiento de biopelículas, ya que para que esta última sea una estrategia exitosa de supervivencia, se requiere la acción conjunta y coordinada de todas las células participantes. Es así como este sistema ha sido descrito en microorganismos como *Streptococcus oralis*, *Actinomyces oris*, *Streptococcus gordonii* y *S. mutans*, entre otros (Wright y cols., 2013).

En relación con *Bifidobacterium* spp. y *quorum sensing*, sólo unos pocos estudios han sido realizados. Jin y cols., (2012), describieron el análisis de la expresión de genes en la respuesta de tolerancia al ácido (ATR por sus siglas en inglés) en *B. longum subsp. longum* BBMN 68, encontrando que la expresión de *luxS*, el gen que codifica para la enzima LuxS, se ve incrementada en ATR. Sun y cols., (2014) reportaron actividad AI-2 producida por especies de *Bifidobacterium*, encontrando finalmente que la sobreexpresión de *luxS* en *B. longum* NCC2705 aumenta la formación de biopelículas. También se obtuvo un aumento en la formación de biopelículas al complementar el cultivo con AI-2 exógeno.

Dado lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la participación del sistema de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2 en *B. dentium*, que no ha sido descrito antes, utilizando *B. dentium* ATCC 27534. Siendo una cepa aislada desde sitios de caries profunda, donde las condiciones son más estresantes, debe tener mecanismos adaptativos como la adhesión y formación de biopelículas, que han sido bien descritos como procesos utilizados para sobrevivir en la profundidad de las lesiones (Matsui & Cvitkovitch, 2010; Wright y cols., 2012). Habiéndose descrito para otros microorganismos, que ambos procesos se relacionan a *quorum sensing* mediado por AI-2, proponemos que la existencia de éste sería beneficioso para la bacteria, promoviendo la adhesión y posterior formación de biopelículas, favoreciendo así su permanencia en los sitios de lesiones de caries.

Con este fin, en este trabajo se analizó la capacidad de *B. dentium* ATCC 27534 de producir y secretar autoinductor 2 (AI-2), a través de la determinación de su presencia en los cultivos, utilizando el sistema reportero *Vibrio harveyi* BAA-1117. Junto con esto, se evaluó además la participación de AI-2 en la adherencia y formación de biopelículas de *B. dentium* ATCC 27534.

3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Bifidobacterium dentium ATCC 27534 posee un sistema de *quorum sensing* LuxS funcional, que a través de autoinductor-2 promueve la adhesión y formación de biopelículas.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la participación del sistema de *quorum sensing* LuxS en la adhesión y formación de biopelículas en *B. dentium* ATCC 27534.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Analizar la presencia y funcionalidad del autoinductor 2 (AI-2) secretado por *B. dentium* ATCC 27534.
- 2.- Evaluar la participación de AI-2 en la adherencia de *B. dentium* ATCC 27534.
- 3.- Evaluar la participación de AI-2 en la formación de biopelículas de *B. dentium* ATCC 27534.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se encuentra adscrito al proyecto Fondecyt Nro. 11150928, cuyos protocolos se encuentran aprobados por el Comité Institucional de Bioseguridad (Anexo 1).

Cepas utilizadas

B. dentium ATCC 27534

Vibrio harveyi ATCC BAA-1117

Cultivos microbiológicos

B. dentium obtenida de la ATCC (*B. dentium* ATCC 27534) se cultivó en medio de cultivo líquido MRS (pH 6,2, Oxoid, UK) suplementado con 0,5 g/L de L-cisteína (MRSc) y en placas agar MRSc (52 g/L MRS, 15 g/L agar, 0,5 g/L de L-cisteína), a 37°C en condiciones anaeróbicas, utilizando sobres AnaeroPack-Anaero MGC® (Sun y cols., 2014).

Vibrio harveyi ATCC BAA-1117 fue cultivado aeróbicamente en medio AB (Autoinducer Bioassay Medium) líquido modificado (1,75% p/v NaCl, 1,23% p/v MgSO₄, 0,2% p/v Triptona, 10 mM K₃PO₄, 1 mM L-arginina, 1% v/v glicerol, pH 7,0) y placas agar AB modificado (1,75% p/v NaCl, 1,23% p/v MgSO₄, 0,2% p/v Triptona, 10 mM K₃PO₄, 1 mM L-arginina, 1% v/v glicerol, 1,5% p/v agar) a 30°C. El crecimiento bacteriano fue monitoreado midiendo la densidad óptica a 600 nm (D.O.600) utilizando un espectrofotómetro UV/Vis UNICAM UV2.

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

Para detectar la presencia y actividad de AI-2 producido por *B. dentium* ATCC 27534, se utilizó el sistema de ensayo reportero *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1117, utilizando el sobrenadante de los cultivos de *B. dentium* ATCC 27534, como se describe en Buck y cols., (2009).

Para esto, se cultivó un preinóculo de *B. dentium* ATCC 27534 en MRS líquido modificado (10 g/L peptona, 8 g/L Lab-Lemco, 4 g/L extracto de levadura, 20 g/L D-galactosa, 0,1% v/v sorbitan mono-oleato, 2 g/L K₂HPO₄, 5 g/L CH₃COONa x 3H₂O, 2 g/L citrato de triamonio, 0,2 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 0,05 g/L MnSO₄ x 4H₂O), reemplazando la glucosa por galactosa pues la glucosa inhibe la

generación de luz en la cepa reportera *V. harveyi*, y suplementado con 0,5 g/L de L-cisteína durante un período de 72 h. a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Luego de este período, se inoculó un cultivo con una D.O.₆₀₀=0,2 inicial, el que fue separado en alícuotas de 2 mL cada una, que se incubaron en 6 jarras independientes, en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 3, 5, 7, 9, 11 y 12 hrs, en triplicado. Esto se realizó con la finalidad de evitar una reiterada exposición a O₂ de los cultivos, y consecuentemente la muerte de las bacterias, de forma que cada una solo fue abierta una vez al momento de la recolección. Se monitoreó el crecimiento bacteriano de cada jarra midiendo y registrando la D.O.₆₀₀ al momento de su apertura. Para obtener el sobrenadante de los cultivos libre de células, cada muestra de 2 mL se centrifugó por 10 min. a 6.000 g, luego se midió su pH utilizando un pH-metro y se neutralizó con NaOH estéril. Subsecuentemente, se filtró el sobrenadante utilizando filtros con una membrana de poro de tamaño 0,2 µm (Syringe Filter BIOFIL®).

Por otro lado, la cepa reportera *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1117, se dejó crecer durante la noche a 30°C en medio AB, y luego fue lavada y re-suspendida en medio AB fresco a una D.O.₆₀₀=0,5 para después ser diluida 1/1.000 en medio AB.

Al momento de medir la luminiscencia se utilizó una placa de poliestireno negra de 96 pocillos NUNC®, a los cuales se agregaron 90 µL de la cepa reportera diluida y 10 µL de sobrenadante previamente procesado de *B. dentium* ATCC 27534 (centrifugado, neutralizado con NaOH y filtrado). Se midió la luminiscencia generada a 30°C, cada 30 min por 4,5 h. en un lector de placas Synergy HT (Biotek®). La actividad de AI-2 se cuantificó en unidades relativas de luminiscencia (U.R.L.) (Sun y cols. 2014). Como control negativo se utilizó la cepa reportera sin sobrenadante de cultivo de *B. dentium*. El experimento se realizó por triplicado, y la luminiscencia fue medida, a su vez, en 3 pocillos por separado, obteniéndose el promedio y desviación estándar en cada caso.

Obtención y preparación de saliva humana

Los análisis de adherencia y formación de biopelículas se realizaron utilizando saliva humana como medio de suspensión, como se describe en Cuadra-Saenz y cols., (2012). Se obtuvo saliva de 3 donantes adultos oralmente

sanos, no fumadores, que no estuvieran en tratamiento con medicación actualmente, ni hubieran sido tratados con antibióticos en los últimos 2 meses, los que fueron examinados intraoralmente en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Este protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética Científica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 2). Se obtuvo el consentimiento informado de cada participante (Anexo 3). Se solicitó a los donantes no consumir alimentos, bebidas ni haberse cepillado con pasta fluorada 2 h. previas a la toma de muestras. Se tomaron las muestras utilizando un tubo cónico estéril, para recolectar 5 mL aproximadamente, las que se mantuvieron a 4°C hasta ser procesadas en el laboratorio. Las muestras de saliva de los donantes se mezclaron y se añadió DTT a una concentración final de 2,5 mM. La mezcla saliva-DTT fue centrifugada a 9.000 g por 40 min a 4°C. El sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta ser requerido, momento en que la muestra congelada se transfirió a temperatura ambiente y se esterilizó por filtración utilizando un filtro de 0,22 µm (Syringe Filter BIOFIL®) para ser utilizada.

Ensayos de adherencia

Este análisis se llevó a cabo como describieron He y cols., (2015) con algunas modificaciones. Se cultivó *B. dentium* ATCC 27534 en medio MRS líquido suplementado con 0,5 g/L de L-cisteína, a 37°C en condiciones anaeróbicas durante 48 h. Luego, 10 µL de este cultivo fueron depositados en placas de poliestireno transparentes de 96 pocillos (Orange Scientific®), junto a 80 µL de las muestras de saliva como medio. Para analizar el efecto de AI-2 se agregaron 10 µL de DPD 0,5% p/v o de sobrenadante de cultivos de *B. dentium* ATCC 27534, que dieron resultados positivos para la presencia de AI-2 en el ensayo con la cepa reportera *V. harveyi*, y se incubaron anaeróticamente a 37°C sin agitar durante 18 h. Subsecuentemente, el medio fue descartado y los pocillos en las placas lavados cuidadosamente 2 veces con 100 µL de PBS (138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, pH 7,0) para remover células no adheridas, agregándose finalmente 100 µL de medio líquido MRS suplementado con 0,5 g/L de L-cisteína final. Pocillos sin células se utilizaron como control negativo. La adherencia fue medida utilizando el ensayo MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-

2-il)-2,5-difenil tetrazolo] (Roche®), y registrando la densidad óptica a 550 nm mediante un equipo SynergyHT (Biotek®).

El cultivo se realizó en duplicado y la adherencia de cada uno, así como su reacción al agregar sobrenadante o DPD, fue evaluada en 3 pocillos distintos, cuyos resultados se promediaron.

Ensayo de formación de biopelículas

Para el análisis de formación de biopelículas, al igual que para el ensayo anterior, se cultivó *B. dentium* ATCC 27534 en medio MRS líquido suplementado con 0,5 g/L de L-cisteína, a 37°C en condiciones anaeróbicas durante 48 h., y se inocularon 70 µL de cultivo líquido en placas de poliestireno de 24 pocillos, que contenían cubreobjetos de vidrio previamente incubados con saliva, 560 µL de saliva y 70 µL de agua destilada, DPD 0,5% p/v o sobrenadante utilizado en la prueba anterior. Luego se dejó crecer durante 3 y 5 días, en las mismas condiciones mencionadas, luego de las cuales el medio es retirado y los cubreobjetos lavados cuidadosamente sumergiéndolos en PBS, para ser finalmente fijados utilizando glutaraldehído. La formación de biopelícula se evaluó utilizando el microscopio JEOL modelo JSM-IT300LV perteneciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido.

Análisis estadísticos

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes resultados obtenidos en cada análisis, se utilizó, para aquellos datos no distribuidos normalmente, el test no paramétrico U Mann-Whitney, para la comparación de dos muestras independientes, considerando como hipótesis nula (H_0) que las medianas de las dos muestras son iguales. Se rechaza la hipótesis nula con valores de $p \leq 0,05$.

5) RESULTADOS

Crecimiento de *B. dentium* ATCC 27534

Se analizó el crecimiento de *B. dentium* ATCC 27534 observándose un crecimiento positivo, que alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a las 11 horas de incubación (Figura 2).

En la figura 2 se puede observar la curva de crecimiento, que presenta inicialmente una fase de adaptación y crecimiento lenta, donde la pendiente o velocidad de crecimiento, medida en el aumento de unidades de absorbancia/hora de incubación, es menor (0,0334/h), alcanzando luego una segunda fase de crecimiento logarítmico que se prolonga hasta las 9 horas de incubación (velocidad 0,0528/h). Finalmente es posible observar una fase estacionaria temprana, donde la velocidad de crecimiento del cultivo disminuye drásticamente (0,01/h).

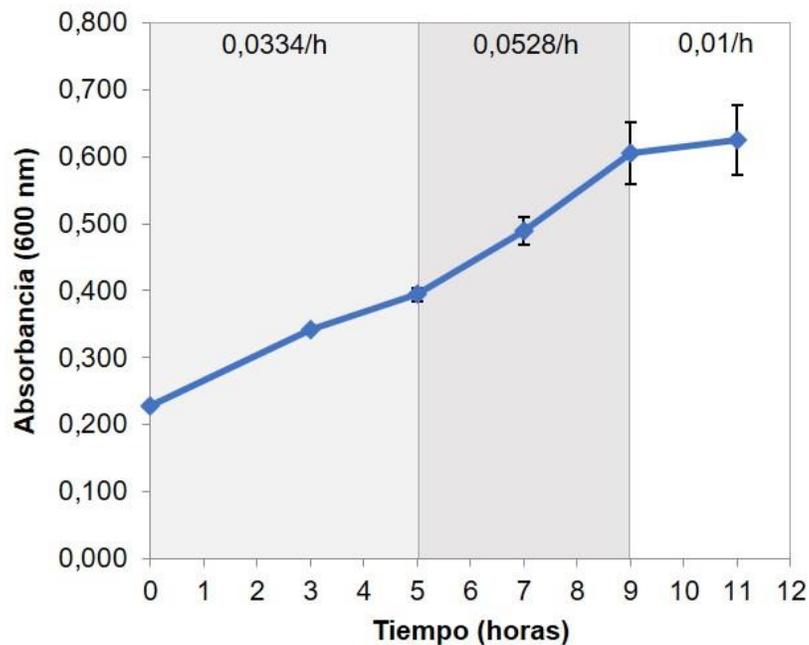


Figura 2. Curva de crecimiento de *B. dentium* ATCC 27534. Se muestran las velocidades de crecimiento en cada etapa, determinada como la pendiente de la recta en dicha zona. Cada determinación corresponde a los promedios de los triplicados con sus respectivas barras de error.

Producción de AI-2 por *B. dentium* ATCC 27534

Con la finalidad de determinar si *B. dentium* ATCC 27534 es capaz de producir autoinductor-2, así como sus niveles dependiendo de la etapa de crecimiento en que se encuentre la bacteria, se analizó la presencia de AI-2 en el sobrenadante de todos los cultivos a lo largo de la curva de crecimiento presentada en la figura 2. Como se muestra en la figura 3, fue posible detectar la presencia de AI-2 a lo largo de toda la curva de crecimiento, no encontrando diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de U.R.L. en cada etapa (5h versus 11h corresponde al menor valor de $p=0,112$ obtenido, U Mann-Whitney).

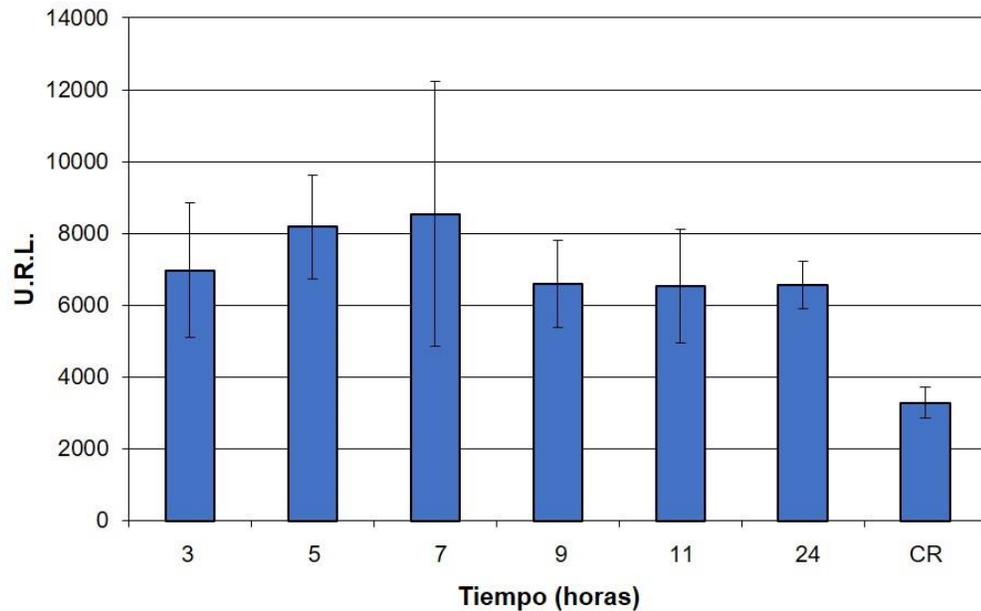


Figura 3. Cuantificación de luminiscencia producida por *V. harveyi* ATCC BAA-1117 al ser expuesto a sobrenadantes de cultivos de *B. dentium* ATCC 27534 en diferentes fases de la curva de crecimiento. U.R.L.: unidades relativas de luminiscencia; CR: control cepa reportera.

Adhesión de *B. dentium* ATCC 27534 y efecto de AI-2

Con la finalidad de determinar el efecto de AI-2 sobre la adhesión de *B. dentium*, se analizó ésta en presencia y ausencia de DPD sintetizado químicamente, el que se interconvierte espontáneamente en medio acuoso a AI-2. Junto con esto, se analizó el efecto en la adhesión del propio sobrenadante de cultivos de *B. dentium* (SN), que previamente dieron positivos para la presencia de AI-2, tal como los SN obtenidos a las 9 y a las 11 horas en la sección anterior (SN9h y SN11h).

Luego de 18 horas de incubación se evidenció adherencia de células viables de *B. dentium* a los pocillos de poliestireno en las placas (figura 4). Se observó que al adicionar DPD, se produjo un aumento en la adhesión, con una diferencia estadísticamente significativa al comparar con *B. dentium* sin DPD ($p=0,00256$).

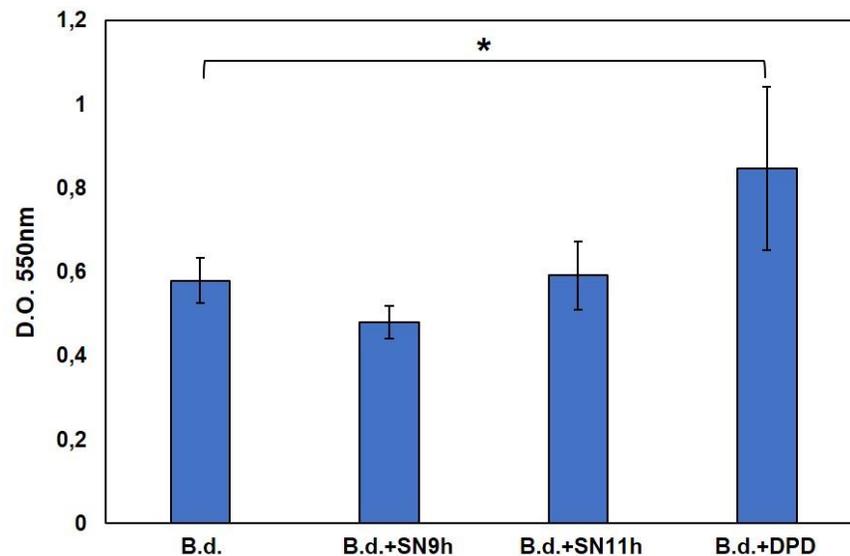


Figura 4. Adhesión de *B. dentium* ATCC 27534 a poliestireno. B.d.: *B. dentium* ATCC 27534; B.d.+SN (9h y 11h): *B. dentium* ATCC 27534 con sobrenadantes de cultivo de 9 y 11 h. de *B. dentium*, positivos para AI-2. B.d.+DPD: *B. dentium* ATCC 27534 con adición de DPD. Con * se muestra diferencia estadísticamente significativa, $p=0,00256$.

En aquellas muestras a las que se adicionó sobrenadante de los cultivos de *B. dentium* que poseían AI-2, SN9h y SN11h, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la adhesión de la bacteria por sí sola ($p=0,058$ y $p=0,468$, respectivamente).

Formación de biopelículas de *B. dentium* ATCC 27534 y efecto de AI-2

Para determinar el efecto de AI-2 sobre la formación de biopelículas de *B. dentium*, de forma similar al ensayo de adhesión, a distintos cultivos del microorganismo en medio líquido se les adicionó DPD sintetizado químicamente o sobrenadante de un cultivo previo positivo para presencia de AI-2 (SN11h). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.

A los 3 días se observa, en el cultivo sin DPD, la adhesión de algunas células a la superficie, estando éstas en su mayoría distribuidas por si solas con algunas agrupaciones de células menores (figura 5A, 3 días). En aquel al que se adicionó SN11h, se visualiza una mayor cantidad de células adheridas, y las agrupaciones parecen ser mayores en tamaño (figura 5B, 3 días). En el caso del ensayo de 3 días con adición de DPD no fue posible encontrar células adheridas a la superficie.

A los 5 días, se observó que la biopelícula en ausencia de DPD presentó una mayor cantidad de células que a los 3 días de incubación (figura 5A, 5 días), que aumentan aún más en aquella de 5 días de incubación a la que se adicionó DPD. Junto con esto, se observó agrupaciones mayores de células, con una matriz de exopolisacáridos rodeándolas en el exterior (Figura 6). Por último, la biopelícula de 5 días a la que se adicionó SN11h presentó escasa cantidad de células adheridas, en su mayoría aisladas y escasas agrupaciones (figura 5B, 5 días).

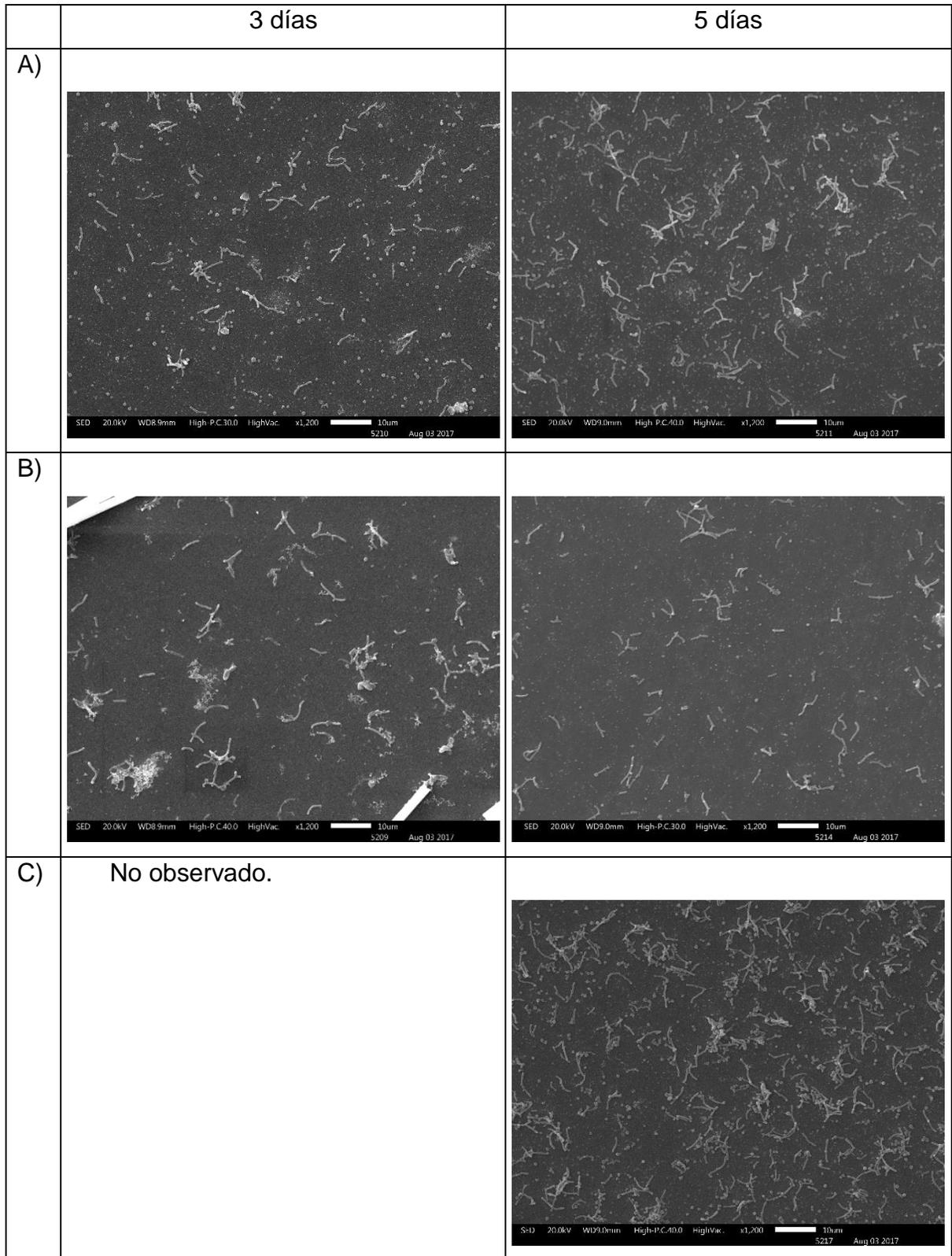


Figura 5: Fotomicrografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) de biopelículas de *B. dentium* ATCC 27534 sobre discos de vidrio embebidos con saliva a los 3 días y 5 días de incubación. Magnificación 1200X. A) *B. dentium*; B) *B. dentium* con sobrenadante positivo para Al-2; C) *B. dentium* con DPD químico.

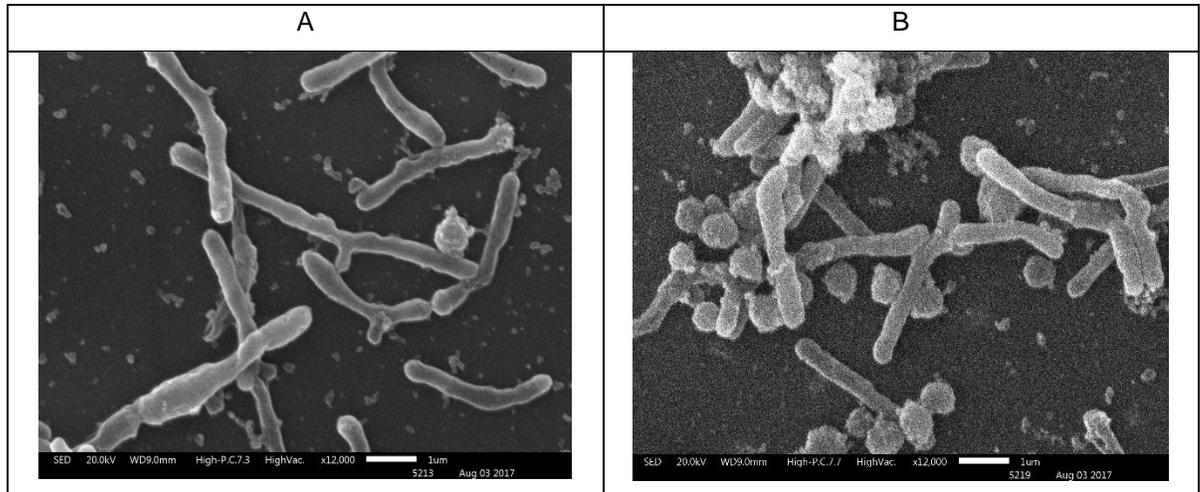


Figura 6: Fotomicrografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) de *B. dentium* ATCC 27534 sobre discos de vidrio embebidos con saliva a los 5 días de incubación. A: biopelícula sin adición de DPD. B: biopelícula desarrollada en presencia de DPD. En esta última se puede observar presencia de exopolisacáridos rodeando las agrupaciones de células. Magnificación 12.000X.

En la figura 6 se observa *B. dentium* polimórficamente ramificado, como se ha descrito anteriormente. En presencia y ausencia de DPD incorporado exógenamente es posible observar que la bacteria mantiene su forma celular característica, indicando que este compuesto no tendría efectos negativos sobre el tamaño, crecimiento y división celular en *B. dentium*.

6) DISCUSIÓN

En este estudio se determinó que *Bifidobacterium dentium* ATCC 27534 posee un sistema de *quorum sensing* LuxS funcional, que a través de la producción y secreción de autoinductor-2, promovería la adhesión y formación de biopelículas, confirmando la hipótesis planteada.

Bifidobacterium dentium ATCC 27534 posee un sistema de *quorum sensing* LuxS funcional, siendo capaz de sintetizar y secretar AI-2 al exterior celular, permitiendo ser detectado en el sobrenadante de sus cultivos, utilizando la cepa reportera *V. harveyi*, que sólo produce luz en presencia de esta molécula. Este hallazgo es el primero descrito para *B. dentium*, pues a pesar de conocerse genes putativos para LuxS en varias especies de *Bifidobacterium*, la presencia de AI-2 en sobrenadantes de cultivos de estos microorganismos solamente había sido descrita para *B. longum* (Sun y cols., 2014).

Esta prueba de luminiscencia demuestra la presencia de AI-2 en el sobrenadante de *B. dentium* durante toda la curva de crecimiento, sin embargo, en este estudio no es posible determinar si dicha presencia se debe a producción y/o uso constante de la molécula, o si al alcanzar cierta concentración en el medio extracelular su producción y utilización se detienen, y por tanto esta molécula sólo se produce al inicio del crecimiento y luego su presencia en el sobrenadante es residual. Es importante notar que la realización de este ensayo no estuvo carente de dificultades. Es posible observar una gran variabilidad de los resultados entre los replicados, y entre las diferentes muestras, siendo poco reproducibles. Esto puede deberse a lo descrito por Sun y cols., (2014), quienes señalan que la actividad de AI-2 se ve afectada por los bajos pH del sobrenadante, y que al neutralizarlo se logra restaurar, aunque no por completo, su actividad. Por esto, ellos describen que este análisis, para el caso de bacterias acidogénicas, confirma la presencia de AI-2 pero no puede utilizarse para cuantificarlo, sino más bien para observar tendencias generales. En el laboratorio se ha determinado que *B. dentium* ATCC 27534 puede disminuir el pH del medio de cultivo hasta 4,64 (datos no mostrados).

El pH del sobrenadante podría no ser el único factor involucrado en la variabilidad observada en los resultados. DeKeersmaecker y Vanderleyden (2003), describen que agregar ácido bórico al sobrenadante libre de células mejoraría la detección de AI-2 por parte de *V. harveyi*, debido a la forma química de AI-2 mayormente disponible en ambiente natural de *V. harveyi* (S-THMF). Por último, la actividad luminiscente de *V. harveyi* podría verse afectada por la presencia de otros componentes en el sobrenadante del cultivo de *B. dentium*.

Mediante el ensayo de adherencia realizado se determinó la participación de AI-2 en la adhesión de *B. dentium* ATCC 27534. Utilizando el ensayo enzimático MTT para determinar la presencia de bacterias adheridas viables, se observó que aquellos pocillos con mayor cantidad de células adheridas fueron aquellos a los que se agregó DPD químico, no observándose una mejora significativa en la adhesión en aquellos pocillos a los que se les agregó sobrenadante. Sin conocer la concentración a la cual se encuentra AI-2 en el sobrenadante, una posible explicación para el resultado obtenido sería la presencia de una cantidad menor de AI-2 en éste. La bacteria fue capaz de adherirse por sí sola en los pocillos donde no se agregó sobrenadante o DPD, aunque menor cantidad. Por tanto, se puede señalar que la presencia de AI-2 tiene un efecto potenciador sobre la capacidad de *B. dentium* para adherirse a superficies.

Un hecho interesante a estudiar sería analizar si AI-2 producido por las propias bacterias durante el ensayo jugaría un rol en su capacidad de adhesión. Esto podría abordarse mediante la utilización de una cepa mutante *luxS* de *B. dentium* que sea incapaz de producir AI-2, teniendo en cuenta la posibilidad de que otros rasgos se vean afectados, como en el caso de *L. acidophilus* NCFM (Buck y cols., 2009), donde se observaron defectos en el crecimiento al ser cultivado en distintas condiciones, como por ejemplo un medio a pH 5,5, siendo esto relevante ya que *B. dentium* es capaz de disminuir el pH de su medio extracelular.

El papel de AI-2 en adhesión no se ha observado para otras especies de *Bifidobacterium*, pero si se ha analizado para otros microorganismos Gram

positivo mediante la generación de mutantes *luxS*. En *S. mutans*, una cepa mutante *luxS* mostró mayor adherencia que la cepa silvestre (He y cols., 2015). Además, se determinó por microscopía confocal que la cepa mutante formaba agregados más dispersos y de mayor tamaño que la silvestre, que formó agregados menores, pero con distribución uniforme (He y cols., 2015). Por otra parte, en *L. acidophilus*, una mutante *luxS* incapaz de producir AI-2, mostró un 58% de disminución de su capacidad de adherirse a células intestinales Caco-2 (Buck y cols., 2009). No se han reportado estudios del efecto de adicionar AI-2 exógeno sobre las etapas tempranas de formación de biopelículas, es decir, la adhesión.

Cabe destacar que en este trabajo se utilizó la prueba de MTT para medir bacterias adheridas, por sobre tinciones tradicionales, ya que permite cuantificar sólo aquellas que permanece viables.

En los ensayos de formación de biopelículas sobre discos de vidrio embebidos en saliva, se observó una mayor adhesión de células a los 5 días de incubación, que aumenta aún más al adicionar al cultivo DPD. Si bien en ningún caso se observó una biopelícula madura de *B. dentium*, el aumento de bacterias adheridas a la superficie da cuenta de la capacidad del DPD para promover la formación de biopelículas. Otro análisis importante de realizar es que al observar la figura 6, es posible distinguir la presencia de estructuras de exopolisacáridos adheridos a las células, en aquella biopelícula a la que se adicionó DPD. De estos resultados se puede inferir que AI-2 promueve la formación de biopelículas al aumentar la producción de exopolisacáridos. En un futuro sería interesante realizar mediciones de esta producción, así como de la expresión de aquellos genes involucrados en la síntesis y excreción de estas moléculas.

Diferente resultado se obtuvo al agregar sobrenadante positivo para AI-2, donde, a los 5 días de incubación, la cantidad de bacterias adheridas a la superficie disminuyó con respecto a la biopelícula sin adición de éste. Este efecto podría deberse a la presencia de otros componentes en el sobrenadante, que tuviesen consecuencias inhibitorias. Un efecto similar fue descrito para *Lactobacillus rhamnosus* GG, donde no fue posible complementar con

sobrenadante de cultivo de *L. rhamnosus* GG silvestre a la cepa mutante para *luxS*, observando incluso un efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas (Lebeer y cols., 2007).

Por otro lado, Ricard y cols., (2006) describen que la concentración de AI-2 presente es de importancia, ya que observaron que la formación de biopelículas es inhibida en *S. oralis* y *A. naeslundii*, sobre y bajo cierta concentración de AI-2. Esto plantea un punto interesante de analizar en un futuro. Establecer qué concentraciones están presentes en el sobrenadante de cultivos de *B. dentium* y qué efectos se obtienen al adicionar a los ensayos distintas concentraciones de DPD. Puede ser que para lograr mayor adhesión y formación de biopelículas no sea suficiente para *B. dentium* la cantidad de AI-2 producida por él mismo, y que requiera la adición de esta molécula desde otras bacterias. Esto abre un abanico de posibilidades sobre cómo podría darse la comunicación bacteriana en comunidades multiespecies, donde cada una de ellas sería capaz de producir moléculas señal hacia el exterior, entre ellas AI-2, las que difundirían hacia sus vecinas, potenciando o inhibiendo el establecimiento en dicho ecosistema, por ejemplo, en la cavidad oral o en un sitio de caries profunda.

7) CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la presencia y participación del sistema de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2 en *B. dentium* ATCC 27534, el cual previamente no había sido descrito para esta bacteria, concluyéndose que:

1.- *B. dentium* ATCC 27534 es capaz de producir y secretar autoinductor-2 funcional al medio externo.

2.- AI-2 promueve la adherencia y formación de biopelículas de *B. dentium* ATCC 27534 sobre superficies sólidas.

Estos hechos permiten inferir que este sistema puede favorecer la permanencia de esta bacteria en sitios de caries.

8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas J., Griffen A., Darlis S., Lee A., Olsen I., Dewhirst F., Leys E. and Paster B. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46:1407-1417.
- Argandoña R., Rodrigues V., Sampaio K., Danelona M., Alex R., de Cássia T., Duquea C. (2016). Comparative *in vitro* investigation of the cariogenic potential of *bifidobacteria*. *Arch Oral Biol* 71:97-103.
- Beighton D., Gilbert S., Clark D., Mantzourani M., Al-Haboubi M., Ali F., Ransome E., Hodson N., Fenlon M., Zoitopoulos L., Gallagher J. (2008). Isolation and identification of *Bifidobacteriaceae* from human saliva. *Appl Environ Microbiol* 74:6457-60.
- Beighton D., Al-Haboubi M., Mantzourani M., Gilbert S., Clark D., Zoitopoulos L. and Gallagher J. (2010). Oral *bifidobacteria*: Caries-associated bacteria in older adults. *J Dent Res* 89:970-974.
- Buck B., Azcarate-Peril M. and Klaenhammer T. (2009). Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 107:269-279.
- Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C. and Scardovi V. (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov. two new species isolated from human dental caries. *Int J Sys Bacteriol* 46:564-571.
- Cuadra-Saenz G., Rao D., Underwood A., Belapure S., Campagna S., Sun Z., Tammariello S. and Rickard A. (2012). Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing *streptococci* in oral biofilms. *Microbiol* 158:1783-1795.
- DeKeersmaecker S. and Vanderleyden J. (2003). Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology* 149:1953-1956.
- Dong Y., Pearce E., Yue L., Larsen M., Gao X. and Wang J. (1999). Plaque pH and associated parameters in relation to caries. *Caries Res* 33:428-436.
- Godoy C., Taliercio T., Olave A., Lozano C., Morales I., Urzúa B., Lefimil C. (2013). Prevalencia y diversidad de *Bifidobacteriaceae* en cavidad oral de niños. XXV Reunión Anual de IADR División Chile. Santiago.

- Haukioja A., Söderling E. and Tenovou J. (2008). Acid production from sugars and sugars alcohols by probiotic *Lactobacilli* and bifidobacteria *in vitro*. *Caries Res* 42:449- 453.
- He Z., Liang J., Tang Z., Ma R., Peng H. and Huang Z. (2015). Role of the *luxS* gene in initial biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *J Mol Microbiol Biotech* 25:60-68.
- Henne K., Gunesch A., Walther C., Meyer-Hueckel H., Conrados G., Esteves-Oliveira M. (2016) Analysis of bacterial activity in sound and cariogenic biofilm: A pilot *in vivo* study. *Caries Res* 50:480-488.
- Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T. and Maeda N. (2009). Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88:982-990.
- Jin J., Zhang B., Guo H., Cui J., Jiang L., Song S., Sun M. and Ren F. (2012). Mechanism analysis of acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN 68 by gene expression profile using RNA-sequencing. *Plos One* 7:e50777.
- Kianoush N., Adler C., Nguyen K., Browne G., Simonian M. and Hunter N. (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *Plos One* 9: e92940.
- Lebeer S., De Keersmaecker S., Verhoeven T., Fadda A., Marchal K., and Vanderleyden J. (2007). Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *J Bacteriol* 189:860-871.
- Mantzourani M., Fenlon M., Beighton D. (2009a). Association between *Bifidobacteriaceae* and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol* 24:32-7.
- Mantzourani M., Gilbert S., Sulong H., Sheehy E., Tank S., Fenlon M. and Beighton D. (2009b). The isolation of *bifidobacteria* from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 43:308-313.
- Matsui R. and Cvitkovitch D. (2010). Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol* 5:403–417.

- Ng W. and Bassler B. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43:197-222.
- Palmer R. (2014). Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol* 2000 64:20-39.
- Pereira C., Thompson J. and Xavier K. (2013). AI-2 mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 37:156-181.
- Pérez I., Burgos A., Becker M., Olave A., Lozano C., Urzúa B., Morales I., Lefimil C. (2014). *Bifidobacterium* spp. en saliva de adultos chilenos: relación con caries. XXVI Reunión Anual de IADR División Chile. Santiago.
- Petersen PE. (2003). The World Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 31: 3-23.
- Preza D., Olsen I., Willumsen T., Boches S., Cotton S., Grinde B. and Paster B. (2009). Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:509-517.
- Rickard A., Palmer Jr R., Blehert, D., Campagna Sh., Semmelhack, M., Eglund, P., Bassler B., Kolenbrander P. (2006). Autoinducer 2: A concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Molecular microbiology*. 60. 1446-56.
- Sun Z., He X., Brancaccio V., Yuan J. and Riedel C. (2014). Bifidobacteria exhibit LuxS-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation. *Plos One* 9:e88260.
- Takahashi N. and Nyvad B. (2011). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J Dent Res* 90:294-303.
- Tanzer J., Livingston J. and Thompson A. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 65:1028-1037.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G., Chater K. and van Sinderen D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:495–548.
- Wolff D., Frese C., Maier-Kraus T., Wolff B. (2012). Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects. *Caries Res* 47:69-77.

- Wright C., Burns L., Jack A., Back C., Dutton L., Nobbs A., Lamont R., Jenkinson H. (2012) Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol* 28:83-101.

9) ANEXOS Y APÉNDICES

ANEXO 1



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

Santiago, 15 de Diciembre de 2015.

C E R T I F I C A D O

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

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

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

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

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

ANEXO 2



FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA | COMITÉ ÉTICO
UNIVERSIDAD DE CHILE | CIENTIFICO

Ed 28/12/2015

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

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

ACTA N°: 2015/11

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

Dr. Eduardo Fernández Godoy
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo O.
Vicepresidente CEC

Sra. Paulina Navarrete C.
Secretaria Ejecutiva CEC

Dr. Alfredo Molina B.
Miembro Alterno

Dr. Roberto La Rosa H.
Miembro permanente del CEC

Dr. Mauricio Baeza Paredes
Miembro permanente del CEC

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

7. Documentación Revisada y Aprobada:

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

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

9.- Fundamentación de la aprobación

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

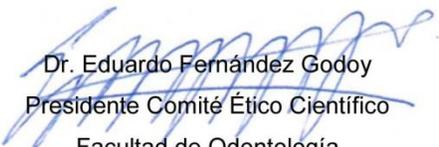
Ed 28/12/2015

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

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

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

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


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



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

ANEXOS 3

Edición del CI 16/12/2015



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

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

Este documento de Consentimiento Informado consta de dos partes:

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

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

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

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

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

Justificación de la Investigación

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



Objetivo

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

Beneficios

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

Tipo de Intervención y Procedimiento

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

Riesgos

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

Criterios para selección de los participantes en el estudio

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

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

Confidencialidad y difusión de datos.

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

Aclaraciones

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



Carta de Consentimiento Informado

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

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

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

Nombre del participante: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

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

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

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

Firma: _____

Fecha: _____

