



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

“Participación de *quorum sensing*, mediante autoinductor-2, en la adhesión y desarrollo de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646”

Ricardo Gabriel Villarroel González

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente, PhD

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Carla Lozano M.

Prof. Alejandro Escobar A.

Adscrito a Proyecto Fondecyt N° 11150928

Santiago-Chile

2018

Dedicatoria

*A mis amigos, mi familia y a todos los que me apoyaron siempre
y estuvieron a mi lado.*

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutora principal, la Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente por su ayuda, dedicación y paciencia incondicional durante el desarrollo de este trabajo de investigación, siempre dispuesta a aclarar mis dudas con la mejor disposición.

A mis tutores asociados, especialmente a la Prof. Carla Lozano M. por acompañarme desde mis inicios en el laboratorio de bioquímica, por su colaboración y apoyo durante este proceso, pero sobre todo por su amistad y cariño incondicional.

Agradezco especialmente a mi compañera de proyecto Pamela García por compartir cordialmente durante todo este proceso.

De manera especial quisiera agradecer también a todo el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, especialmente a Andrea Cortés, Viviana Toledo, Sarita Soto y Katherine Vera, por su ayuda y orientación durante el desarrollo de esta investigación, y por su buena disposición y el cariño entregado durante estos años de trabajo en el laboratorio.

A mi familia, especialmente a mi madre Ximena, mi padre Ricardo y mi hermana Camila por su paciencia y apoyo durante toda la carrera, especialmente durante las etapas más difíciles.

Finalmente agradezco a todos mis amigos, especialmente a Valentina, César, Daniel, Rocío, Claudia, Pamela, Felipe, Rodrigo, Alvin, Carolina, Monserrat, Nahuel, Pedro, Roberto y tantos otros por siempre estar ahí, ayudarme a seguir adelante y compartir muy buenos momentos juntos.

ÍNDICE

RESUMEN	5
MARCO TEÓRICO.....	7
Caries dental y el proceso de caries	7
<i>Lactobacillus</i> spp. y caries dental.....	9
Interacciones bacterianas en la biopelícula dental.....	12
<i>Quorum sensing</i> en bacterias orales.....	12
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
METODOLOGÍA.....	17
Cepas Bacterianas.....	17
Cultivo Bacteriano.....	17
Detección de la producción de autoinductor-2 por <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 4646.....	17
Obtención y preparación de saliva humana.....	18
Ensayo de Adherencia.....	19
Ensayo de Formación de Biopelícula.....	20
Estadística.....	21
RESULTADOS.....	22
Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 4646.....	22
Producción de autoinductor-2 por <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 4646.....	23
Adhesión de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 4646 y efecto de autoinductor-2.....	24
Formación de Biopelícula de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 4646.....	26
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	32
SUGERENCIAS.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	37

RESUMEN

Introducción: *Lactobacillus casei* es una especie bacteriana con forma de bastón, Gram positivo, no formadora de esporas, acidogénica, acidúrica y anaerobia facultativa, que es frecuentemente relacionada con la fermentación de carbohidratos, produciendo ácido láctico como su principal producto final. Este microorganismo ha sido aislado desde sitios activos de caries y se ha asociado con la presencia y progresión de esta patología. Se encuentra formando parte de la biopelícula dental, donde las especies bacterianas pueden comunicarse entre sí mediante *quorum sensing*. Un tipo de *quorum sensing* se produce por una molécula interconvertible, llamada autoinductor-2 (AI-2), producida por la enzima LuxS. Se ha descrito que este sistema participa en el desarrollo de la comunidad, formación de biopelícula, colonización y virulencia en varias especies bacterianas, pero no se ha investigado su efecto en *L. casei*. El objetivo de este estudio fue determinar la participación del sistema *quorum sensing* mediante AI-2, en la adhesión y formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646.

Materiales y métodos: la producción de AI-2 por *L. casei* ATCC 4646 fue determinada mediante el sistema de ensayo reportero *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1117, detectando su presencia en sobrenadantes de cultivos de *L. casei* ATCC 4646 obtenidos en distintas etapas de crecimiento. La adhesión de *L. casei* ATCC 4646 y el efecto de AI-2 sobre ésta, se analizó a las 16 horas de incubación en microplacas de poliestireno de 96 pocillos en presencia o ausencia de DPD (AI-2 sintetizado químicamente), utilizando saliva y medio de cultivo. La adherencia bacteriana se midió usando el ensayo MTT y un equipo SynergyHT (Biotek®). El ensayo de formación de biopelículas y efecto del DPD se realizó sobre cubreobjetos de vidrio embebidos en saliva, con incubación durante 3 días, bajo las mismas condiciones que el ensayo de adherencia, y se documentó con un microscopio electrónico de barrido (JSM-IT300, JEOL).

Resultados: Se detectó la presencia de AI-2 en el sobrenadante del cultivo de *L. casei* ATCC 4646, comprobándose así que es capaz de producirlo y secretarlo al medio extracelular. Se observó que en presencia de AI-2, este microorganismo es capaz de aumentar su adhesión a superficies sólidas. Junto con esto, la adición de AI-2 aumenta la capacidad de *L. casei* para formar biopelículas, observándose tanto una mayor cantidad de bacterias adheridas, como una mayor agregación bacteriana.

Conclusiones: Mediante estos resultados, se puede afirmar que *L. casei* ATCC 4646 posee un sistema de *quorum sensing* mediado por AI-2 funcional, que actúa sobre este microorganismo aumentando su capacidad de adhesión a superficies y formación de biopelículas.

MARCO TEÓRICO

Caries dental y el proceso de caries

La caries dental es una de las enfermedades orales crónicas más prevalentes a nivel mundial, afectando entre el 60 al 90% de niños en edad escolar y a la mayoría de los adultos (Petersen, 2003; Simón-Soro y Mira, 2015). Es una enfermedad de etiología polimicrobiana y multifactorial, formada por una compleja interacción en el tiempo entre bacterias productoras de ácido y carbohidratos fermentables sobre la superficie dental, afectada por factores del hospedero, como saliva, exposición a fluoruros, entre otros (Selwitz y cols., 2007; Petersen, 2003). Esta interacción puede generar la lesión de caries, que es la destrucción localizada de tejidos duros del diente debido a la exposición a ácidos producidos por la fermentación bacteriana de carbohidratos provenientes de la dieta, provocando así un flujo hacia el exterior del diente, de calcio, fosfato y carbonato, que conforman la hidroxiapatita, estructura básica del esmalte dental, terminando en una pérdida neta de mineral (Takahashi y Nyvad, 2011; Selwitz y cols., 2007). Los signos de la desmineralización cariosa se ven en los tejidos duros del diente, pero el proceso de la enfermedad comienza dentro de la placa o biopelícula bacteriana sobre la superficie dental (revisado en Bowen y cols., 2017).

La biopelícula dental es un ecosistema microbiano dinámico, donde bacterias viven en microcolonias encapsuladas en una matriz orgánica de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, secretados por ellas mismas, que les provee protección contra la desecación, defensas del hospedero y resistencia mejorada a agentes antimicrobianos. El diente ofrece numerosas superficies para la colonización bacteriana, donde un gran número de bacterias y sus productos metabólicos se acumulan en biopelículas tanto en superficies dentales sanas como enfermas (Selwitz y cols., 2007). Entre los mecanismos que permiten la formación de la biopelícula dental se encuentran la adhesión, la agregación y la coagregación bacteriana. La adhesión consiste en la unión de los microorganismos a los tejidos del hospedero, la agregación permite la adhesión de

los microorganismos a otros de su misma especie, mientras que la coagregación se refiere a la adhesión entre microorganismos de diferente especie. (Prescott y cols., 1999; Hojo y cols., 2009). Los microorganismos que no logran adherirse a las superficies dentales del hospedero o a bacterias adheridas previamente, son incapaces de participar en el desarrollo de comunidades y son sujetas a eventuales desplazamientos debido al flujo de saliva y a otras fuerzas mecánicas de remoción (Wright y cols., 2012).

Se ha descrito que ciertas especies bacterianas inician la formación de comunidades al interactuar directamente con la película salival adquirida que se ha depositado sobre superficies dentales nuevas disponibles, estableciendo así una biopelícula (Wright y cols., 2012). Estos colonizadores tempranos son componentes de la microbiota normal, y corresponden principalmente a miembros del grupo de *Streptococcus* no mutans (*S. sanguinis*, *S. oralis*, y *S. mitis*, principalmente) y *Actinomyces* spp. (Takahashi y Nyvad, 2011).

Bajo condiciones de salud oral, los microorganismos en la cavidad oral viven en una relación simbiótica con el hospedero. Cuando se produce un desequilibrio entre los minerales del diente y las biopelículas bacterianas, se genera la caries dental (Wright y cols., 2012). El proceso de caries comienza con la producción de ácidos orgánicos débiles, como producto del metabolismo de carbohidratos fermentables por bacterias endógenas, principalmente del grupo *Streptococcus* del tipo mutans (*S. mutans* y *S. sobrinus*, entre otras) y *Lactobacillus* spp., presentes en la biopelícula dental. Estos ácidos son apropiadamente neutralizados por la capacidad tampón de la saliva, manteniendo un ciclo natural de pH dinámicamente estable. Sin embargo, con un consumo regular de carbohidratos fermentables, mala higiene oral o flujo salival alterado, el ciclo natural de pH es interrumpido (Selwitz y cols., 2007). Esta producción constante de ácidos orgánicos induce que las bacterias se deban adaptar al microambiente más ácido y, como consecuencia, ocurre una selección de microorganismos ácido-resistentes. En esta etapa, el microambiente ácido se ha

establecido, incrementando y promoviendo el desarrollo de la lesión dental (Takahashi y Nyvad, 2011; Selwitz y cols., 2007).

Se ha descrito que las comunidades bacterianas asociadas a la caries dental son muy diversas, pudiendo existir diferente composición de especies bacterianas entre personas y entre lesiones de caries, siendo un factor crucial el nivel de avance de la lesión. Un ejemplo es *S. mutans*, cuyo recuento aumenta en lesiones de caries respecto a sitios sanos, pero a pesar de que *S. mutans* ha sido una especie fuertemente asociada a caries dental por décadas, estudios recientes han determinado que su recuento es menor al 1% en lesiones de caries, y que otras especies de géneros tales como *Veillonella*, *Rothia* y *Leptotrichia* en esmalte, así como *S. sanguinis*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Schlegelella*, *Bifidobacterium*, *Pseudoramibacter* y *Lactobacillus* en lesiones de caries dentinaria, pueden jugar un papel más preponderante en estas comunidades microbianas (Simón-Soro y cols., 2014; Aas y cols., 2008; Takahashi y Nyvad, 2011; Kianoush y cols., 2014). Numerosos estudios han demostrado que la diversidad en la población microbiana disminuye con el aumento en la profundidad de la lesión de caries, que se torna más ácido y anaerobio (Preza y cols., 2009; Kianoush y cols., 2014). Es desde estas lesiones de caries profundas donde *Lactobacillus* spp. se han aislado más frecuentemente.

Lactobacillus spp. y caries dental

Las bacterias ácido-lácticas constituyen un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivo, no formadoras de esporas y anaerobias facultativas que son frecuentemente relacionadas con la fermentación de los carbohidratos, produciendo ácido láctico como principal producto final. El género más grande y diverso de bacterias ácido-lácticas es *Lactobacillus*, un grupo bacteriano versátil con forma de bastón que actualmente alberga 237 especies (Figura 1) (Euzéby y Parte, 2016).

Lactobacillus spp. ha sido aislado desde una amplia variedad de hábitats, incluyendo productos lácteos crudos y fermentados, sistemas reproductivos y gastrointestinales de humanos y animales, entre otros (Klander y Weiss, 1986). *Lactobacillus* spp. aislados desde el tracto gastrointestinal o la vagina humana, son considerados como miembros de la microbiota autóctona humana, confiriendo efectos beneficiosos para el hospedero, ya que estimulan la inmunidad natural y contribuyen al balance de la microbiota al excluir la colonización de patógenos exógenos (Saulnier y cols., 2009). Sin embargo, algunas especies de *Lactobacillus* han sido consideradas por décadas como un agente etiológico de la caries dental, siendo rutinaria y consistentemente aisladas desde lesiones de caries activas y sistemáticamente asociadas con la presencia y progresión de esta patología (Nancy y Dorignac, 1992; Caufield y cols., 2007; Kianoush y cols., 2014).

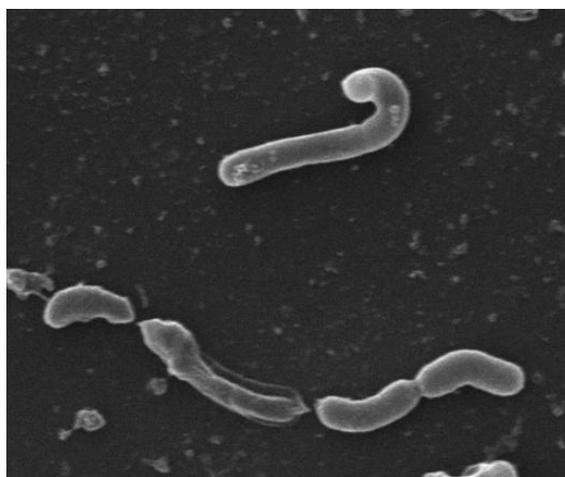


Figura 1. Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido (SEM) de *L. casei* ATCC 4646 sobre discos de vidrio embebidos con saliva. Magnificación 7000X. Imagen obtenida en esta Tesis.

Las especies de *Lactobacillus* son conocidas por ser prolíficas productoras de ácido láctico (acidogénicas) y un gran número de estudios han confirmado la fuerte asociación entre su presencia y el desarrollo de lesiones de caries, siendo identificadas como uno de los mayores agentes responsables de la caries dental (Piwat y cols., 2012; Almstahl y cols., 2012).

Van Houte y cols. (1981) reportaron un estudio acerca de la microbiota oral presente en la superficie dental de sujetos con experiencia de caries, aislando *Lactobacillus* spp. en aproximadamente el 50% de las muestras de placa asociadas a lesiones de caries. Nancy y Dorignac (1992), analizaron muestras de dentina cariada en niños de 5 a 15 años de edad, encontrando presencia de *Lactobacillus* spp. en el 100% de las muestras, determinando que la experiencia de caries (determinada como el número de dientes cariados, perdidos por caries u obturados) y *Lactobacillus* spp. en dentina estaban vinculados. Siguiendo los estudios de prevalencia de *Lactobacillus* spp. en lesiones de caries, numerosas investigaciones fueron realizadas para determinar cuál especie de este género podría estar implicada en el proceso de generación de lesiones de caries. Diversos estudios aislaron e identificaron especies del género *Lactobacillus* provenientes tanto de sujetos con y sin caries dental, ya sea niños o adultos, siendo las más prevalentes *L. casei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* y *L. salivarius* (Marchant y cols., 2001; Lima y cols., 2011; Wolff y cols., 2013). Sin embargo, Byun y cols. (2004), mediante cuantificación por PCR en tiempo real, reportaron que *L. gasseri* y *L. ultunensis* son las especies más prevalentes en lesiones de caries profundas.

A la fecha, no hay reportes que caractericen las especies de *Lactobacillus* presentes en la cavidad oral en la población chilena, o que aborden su asociación con la caries dental. En un estudio preliminar en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de nuestra Facultad, se analizaron especies de *Lactobacillus* presentes en la cavidad oral de 8 niños chilenos sin experiencia de caries y 9 con lesiones de caries profunda (Luzanto, 2016). Se observó que en las muestras de saliva de niños con lesiones de caries profunda y de las muestras provenientes desde estas lesiones, *L. salivarius* y *L. casei*, respectivamente, fueron las especies de *Lactobacillus* más frecuentemente aisladas.

Interacciones bacterianas en la biopelícula dental

En la biopelícula dental, las distintas especies bacterianas interactúan de diversas maneras. Por un lado, existe la comunicación metabólica, donde la secreción de un metabolito por un microorganismo se puede utilizar como nutriente por un microorganismo diferente, o a través de la degradación de sustratos por enzimas extracelulares de un microorganismo, creando disponibilidad biológica de sus subproductos para otros microorganismos (revisado en Hojo y cols., 2009; Wright y cols., 2012). Por otro lado, pueden interactuar competitivamente, produciendo bacteriocinas u otros compuestos químicos producidos por bacterias para inhibir el crecimiento de otras especies o cepas bacterianas (Hojo y cols., 2009).

Por último, se ha descrito un sistema de comunicación entre los microorganismos llamado *quorum sensing*, que opera dentro de la biopelícula (Ng y Bassler, 2009; Wright y cols., 2012).

Quorum sensing en bacterias orales

El *quorum sensing* es un proceso de comunicación química entre bacterias. Éstas producen, detectan y utilizan químicos extracelulares para monitorear la cantidad de población celular microbiana. Esto permite modificar la expresión de genes en forma sincronizada, actuando como una unidad. *Quorum sensing* influencia un amplio espectro de funciones tales como, virulencia, tolerancia al ácido, formación de biopelícula, entre otros. Los químicos extracelulares son moléculas de bajo peso molecular, conocidos como autoinductores. Los autoinductores son producidos por bacterias, secretándolos hacia afuera de la célula. Cuando la concentración de autoinductores alcanza el umbral requerido para la detección, los receptores en las bacterias (de la misma o de otras especies) se activan y se produce una cascada de transducción de señales, la que es responsable de la modificación de la expresión génica (Ng y Bassler, 2009).

Se han descrito dos sistemas principales de *quorum sensing* en bacterias Gram positivo (revisado en Pereira y cols., 2013). En el primero, estos microorganismos utilizan oligopéptidos modificados como autoinductores, genéticamente codificados, cuya secreción es mediada por transportadores de membrana especializados. El receptor para estos autoinductores se encuentra unido a la membrana, el cual transduce la señal a través de una serie de eventos de fosforilación al unirse la molécula de autoinductor.

El segundo sistema de señales incluye un conjunto de moléculas interconvertibles, llamado autoinductor-2 (AI-2), originado a partir de 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD). DPD es producido por la enzima LuxS, utilizando S-ribosil-homocisteína (SHR) como sustrato. DPD se cicla espontáneamente en diferentes isómeros en solución. La primera estructura es una molécula cíclica borada, denominada S-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofuranborato (S-THMF-borato). La segunda molécula corresponde a una estructura no borada, R-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano (R-THMF). Ambos están en equilibrio con DPD y pueden rápidamente interconvertirse. La formación de DPD mediante la enzima LuxS conduce a la liberación de homocisteína, una molécula intermediaria de la síntesis de metionina. Este hecho indica que la producción de AI-2 está directamente relacionada con el metabolismo de aminoácidos (Rickard y cols., 2006; Pereira y cols., 2013).

AI-2 es una molécula hidrofílica y debe ser transportada al exterior celular a través de la membrana, mediante un transportador específico. YdgG se ha propuesto como un potencial exportador de AI-2 en *E. coli*. Otras dos proteínas han sido descritas como receptores de membrana para las moléculas de AI-2, LuxP y LsrB. También en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, RbsB se ha sugerido como una proteína receptora putativa. Sin embargo, en otros microorganismos todavía no está claro cómo AI-2 es transportado fuera de la célula (revisado en Pereira y cols., 2013).

En la literatura, existen estudios sobre el papel de AI-2 en la cavidad oral. Se ha investigado su papel en el desarrollo de la comunidad, formación de biopelícula, colonización y virulencia (revisado en Wright y cols., 2012). Por ejemplo, se ha descrito que el AI-2 producido por *S. oralis* influye positivamente en el crecimiento en biopelícula de *Actinomyces oralis* (Rickard y cols., 2006). También, McNab y cols. (2003), describieron que se requiere AI-2 para el desarrollo en biopelícula de *S. gordonii* y para el desarrollo en comunidad con *Porphyromonas gingivalis*. En *S. mutans*, se ha descrito que una cepa deficiente de LuxS tiene una expresión afectada de genes implicados en la reparación del ADN, el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, síntesis de proteínas y tolerancia al estrés y una disminución en la formación de biopelículas (Wen y cols., 2011). También, en *S. mutans*, los estudios indican que su resistencia al ácido disminuye cuando el gen *luxS* es defectuoso (Wen y Burne, 2004).

Lebeer y cols. (2007) informaron que *L. rhamnosus* GG produce AI-2, e identificaron un ortólogo de *luxS* en este microorganismo. Además, construyeron una cepa mutante para el gen *luxS* incapaz de sintetizar AI-2, confirmando que el autoinductor se produce por la enzima LuxS en este microorganismo. Además, el mutante *luxS* mostró un crecimiento disminuido y un defecto en la formación de biopelículas monoespecie. Moslehi-Jenabian y cols. (2007) estudiaron el efecto del estrés ácido sobre LuxS mediado por *quorum sensing* en cuatro diferentes especies de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* GG, *L. salivarius* UCC118, *L. acidophilus* NCFM y *L. johnsonii* NCC533). Las dos últimas especies mencionadas produjeron una baja cantidad de AI-2, en comparación con las dos primeras en condiciones de crecimiento estándar. En *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* NCFM se observó un aumento de la producción de AI-2 con la disminución del pH, lo que sugiere que el sistema LuxS parece tener un papel en la respuesta al estrés ácido.

A pesar de que se ha investigado el rol de AI-2 en diversos microorganismos de la cavidad oral, incluyendo algunas *Lactobacillus* spp., no se ha indagado su rol en *L. casei*. Además, los microorganismos que viven en lesiones de caries profundas, donde las condiciones de vida son más estresantes

(es decir, el pH es más ácido, ambiente más anaeróbico, escasa disponibilidad de fuentes de energía), como *L. casei*, poseen mecanismos de adaptación, como la respuesta de tolerancia al ácido y la formación de biopelículas, que han sido bien descritos como mecanismos utilizados para sobrevivir en lesiones de caries, los cuales se han relacionado con *quorum sensing* mediado por LuxS en otros microorganismos (Matsui y Cvitkovitch, 2010; Wright y cols., 2012). En base a los antecedentes expuestos, el objetivo de este estudio fue investigar por primera vez el papel funcional del sistema LuxS en *L. casei*. Para esto, se analizó la capacidad de *L. casei* ATCC 4646 de producir y secretar AI-2, a través de la determinación de su presencia en los cultivos y la utilización del sistema reportero *Vibrio harveyi* BAA-1117. Junto con esto, se evaluó la participación de AI-2 en la adherencia y formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646.

El estudio de la comunicación de este microorganismo y la cascada de regulaciones que le permite crecer en el entorno inusual de una lesión de caries puede proporcionar nuevas estrategias para entender su participación en el proceso de generación de la misma.

HIPÓTESIS.

El sistema de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2 funcional está presente en *Lactobacillus casei* ATCC 4646, promoviendo su adhesión y formación de biopelículas.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la participación del sistema *quorum sensing* mediante autoinductor-2, en la adhesión y formación de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar si *Lactobacillus casei* ATCC 4646 es capaz de secretar autoinductor-2 funcional.
- Demostrar la participación de autoinductor-2 en la adherencia de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.
- Evaluar el efecto de autoinductor-2 en la formación de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646.

METODOLOGÍA

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

Cepas Bacterianas

Se obtuvieron las cepas bacterianas *Lactobacillus casei* ATCC® 4646™ que fue originalmente recolectada desde muestras provenientes de lesiones de caries, y *Vibrio harveyi* ATCC® BAA-1117™, desde la American Type Culture Collection (ATCC).

Todos los ensayos presentados a continuación se hicieron por triplicado:

Cultivo Bacteriano

L. casei ATCC 4646 fue cultivada tanto en medio líquido como sólido MRS (pH 6,2, Oxoid, UK) a 37°C en condiciones anaerobias (Piwat y cols., 2010). Las placas de cultivo se dejaron crecer por 48 h, y los cultivos líquidos por diferentes tiempos dependiendo de los requisitos de cada experimento. *V. harveyi* ATCC BAA-1117 se cultivó aeróbicamente en medio líquido AB modificado (medio Autoinducer Bioassay (AB) modificado: 1,17% P/v NaCl, 1,23% P/v MgSO₄, 0,2% P/v Triptona, 10mM K₃PO₄, 1mM L-Arginina, 1% V/v glicerol, pH 7), a 30°C en condiciones estáticas.

El crecimiento bacteriano en medio de cultivo líquido de ambos microorganismos fue monitorizado por medición de la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un espectrofotómetro.

Detección de la producción de autoinductor-2 por *Lactobacillus casei* ATCC 4646

La actividad de AI-2 se detectó usando el sistema de ensayo con la cepa de *V. harveyi* ATCC BAA-1117. La detección se realizó utilizando el sobrenadante de cultivo de *L. casei*, como lo describe Buck y cols. (2009). Brevemente, *L. casei* creció en 100 mL de medio MRS modificado (10 g/L peptona, 8 g/L Lab-Lemco, 4 g/L extracto de levadura, 20 g/L galactosa, 0,1% V/v sorbitan mono-oleato, 2 g/L

K_2HPO_4 , 5 g/L $CH_3COONa \times 3H_2O$, 2 g/L citrato de triamonio, 0,2 g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,05 g/L $MnSO_4 \times 4H_2O$) (se reemplaza glucosa por galactosa debido a que el primer azúcar produce un catabolito represor de la cepa reportera *V. harveyi* que impide su producción de luz). Cada 1 h, durante 10 h, se tomó 1 mL de cultivo y se registró su D.O.₆₀₀ para determinar el crecimiento de la cepa. Además, se tomaron alícuotas de 4 mL cada hora, se obtuvo el sobrenadante por centrifugación, y se neutralizó el pH con NaOH 1M estéril. Posteriormente, el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2 μm (BIOFIL® Syringe Filter). Estos sobrenadantes se guardaron a -20°C hasta su análisis.

Luego se cultivó la cepa reportera *V. harveyi*, dejándola crecer durante la noche en medio AB, para luego lavarla y resuspenderla en medio fresco a D.O.₆₀₀ de 0,5. En esta etapa, se realizó una dilución 1/1000 v/v de la cepa reportera, para luego cultivar alícuotas de 90 μL en múltiples pocillos en una placa de 96 pocillos (NUNC®), añadiéndole 10 μL de cada uno de los 10 sobrenadantes estériles obtenidos del cultivo de *L. casei* (centrifugado, neutralizado con NaOH y filtrado) a cada pocillo (relación 1:9). Como blanco se utilizó 90 μL de medio AB con 10 μL de medio MRS-modificado; como un control negativo se cultivó 90 μL de *V. harveyi* con 10 μL de medio MRS-mod; como control positivo se cultivó 90 μL de *V. harveyi* con 10 μL de un sobrenadante previamente comprobado a contener AI-2 y expresar luminiscencia. Cada uno de estos cultivos se realizó por triplicado.

Se determinó la luminiscencia a 30°C cada 10 min durante 6 h en un lector de placas Synergy System HT/FLx800 (Biotek®). Se cuantificó la actividad de AI-2 como unidades relativas de luminiscencia (U.R.L.).

Obtención y preparación de saliva humana

Para realizar los análisis de adherencia y formación de biopelículas, se necesitaron muestras de saliva humana. La saliva se preparó como describe Cuadra-Saenz y cols. (2012). Se recolectó saliva de 5 donantes adultos sanos (sin caries u otra patología oral, sin enfermedades sistémicas, no fumadores, sin consumo de antibióticos durante los 2 meses previos y sin consumo de

medicamentos al momento de la toma de muestra). Se solicitó a los donantes no consumir comida o bebestibles ni cepillarse los dientes las 2 h previas a la recolección de saliva. El protocolo de este estudio fue evaluado y aprobado por los Comités de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexos 1 y 2). Para cada participante, se obtuvo un consentimiento informado (Anexo 3). El examen y toma de muestras se realizó en el Servicio de Diagnóstico de la Clínica Odontológica que pertenece a dicha unidad. Se tomaron aproximadamente 2 mL de muestra de saliva de cada voluntario donante, la cual fue depositada en tubos cónicos estériles. Se conservaron las muestras a 4°C por 15 min hasta ser procesadas en el laboratorio. La saliva recolectada de ambos donantes se mezcló y se añadió DTT a una concentración final de 0,5 mM. La mezcla de saliva-DTT se centrifugó a 6.000 g por 40 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C. Cuando fue requerida la mezcla de saliva-DTT en los ensayos de adherencia y de formación de biopelícula, éstas se llevaron a temperatura ambiente para luego ser esterilizada mediante un filtro de 0,22 µm (BIOFIL® Syringe Filter).

Ensayo de Adherencia

Con el objetivo de determinar la adherencia bacteriana durante la fase inicial de formación de biopelícula, se analizó la adherencia después de 16 horas de incubación, como describe He y cols. (2015). Se cultivó *L. casei* hasta fase exponencial media. Luego, se recolectó una alícuota del cultivo, se centrifugó a 5.000 g por 10 min, se eliminó el sobrenadante, se lavó y resuspendió en tampón PBS estéril a pH 7,4 hasta llegar a una D.O.₆₀₀ de 1,0 final. La bacteria resuspendida se diluyó a 1:10 ^{v/v} y se inoculó en una placa de poliestireno de 96 pocillos (Orange Scientific®), usando 80 µL de saliva como medio. Se conformaron 4 grupos experimentales, donde en el primero se incubó 10 µL de *L. casei* con 10 µL de agua destilada, en el segundo grupo se incubó 10 µL de *L. casei* con 10 µL de un sobrenadante de *L. casei* que contiene AI-2 comprobado en el experimento de luminiscencia, en el tercer grupo se incubó 10 µL de *L. casei* con 10 µL de DPD, y se utilizó como control negativo de adhesión, y como blanco

en la medición de la D.O.₆₀₀ 10 µL de medio de cultivo MRS y 10 µL de agua destilada. Cada uno de estos cultivos se realizó por triplicado.

Estas placas se incubaron a 37°C por 15 h sin agitación. Luego de la incubación, el medio se descartó y se lavó cada pocillo dos veces con 100 µL de PBS estéril para remover las células no adheridas. Luego se agregó 100 µL de medio MRS. La adhesión bacteriana se determinó usando el ensayo MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (Roche®). Este ensayo se realizó según instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificaron los resultados midiendo la D.O.₅₅₀ mediante un equipo SynergyHT (Biotek®).

Ensayo de Formación de Biopelícula

Para determinar la formación de biopelículas bajo influencia de AI-2, se cultivó *L. casei* durante 16 h a 37°C en condiciones anaerobias. El cultivo de *L. casei* se centrifugó por 10 min a 5.000 g, se desechó el sobrenadante, y se resuspendió en MRS hasta llegar a una D.O.₆₀₀ de 1,0 final. Por otra parte, se pretrataron dos cubreobjetos circulares, colocándolos en una placa de 24 pocillos (Costar® 3526) y depositando 200 µL de saliva estéril procesada anteriormente, sobre ellos. La placa se incubó a 37°C por 1 h en agitación orbital, para permitir la adhesión de las proteínas salivales a la superficie del cubreobjetos de vidrio. Luego se lavó cada cubreobjetos en PBS, sumergiéndolos una sola vez.

Para el ensayo de formación de biopelículas propiamente tal, se agregó a dos pocillos 800 µL de medio MRS, se sumergieron los cubreobjetos pretratados y se agregó 100 µL de *L. casei* a 1,0 de D.O.₆₀₀. A uno de estos pocillos se agregó 100 µL de agua destilada, y al otro 100 µL de DPD quedando 5µM final. Se dejó incubar por 72 h. Posteriormente, se trasladaron los cubreobjetos a pocillos con 400 µL de tampón PBS, para dejarlos en agitación orbital por 5 min. Luego los cubreobjetos se transportaron a pocillos con 300 µL de glutaraldehído 5% v/v en agitación orbital por 3 h. Luego se refrigeraron hasta su análisis por microscopía de barrido en el microscopio JEOL modelo JSM-IT300LV perteneciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Odontología. Las imágenes obtenidas fueron analizadas de manera descriptiva.

Estadística

Para el análisis de datos distribuidos sin normalidad se utilizó el test no paramétrico U Mann-Whitney, para la comparación de dos muestras independientes, considerando como hipótesis nula (H0) que las medianas de las dos muestras son iguales. Se rechaza la hipótesis nula con valores de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 4646

Con la finalidad de caracterizar el crecimiento de *L. casei* ATCC 4646 previo a la evaluación de la producción de AI-2, se realizó una curva de crecimiento (Figura 2). Se puede observar que *L. casei* ATCC 4646 presenta inicialmente una fase de latencia, de adaptación y desarrollo lento, con una velocidad de crecimiento, determinada mediante la pendiente de la recta de cada sección, de 0,145/h (aumento de unidades de absorbancia/hora de incubación), que se prolonga hasta las 2 horas (Figura2, panel A). A continuación, se aprecia una segunda fase de crecimiento exponencial que se prolonga hasta las 6 horas de incubación con una velocidad de crecimiento de 0,275/h (Figura2, panel B). Finalmente es posible observar la fase estacionaria, donde la velocidad de crecimiento del cultivo disminuye drásticamente a 0,080/h (Figura2, panel C).

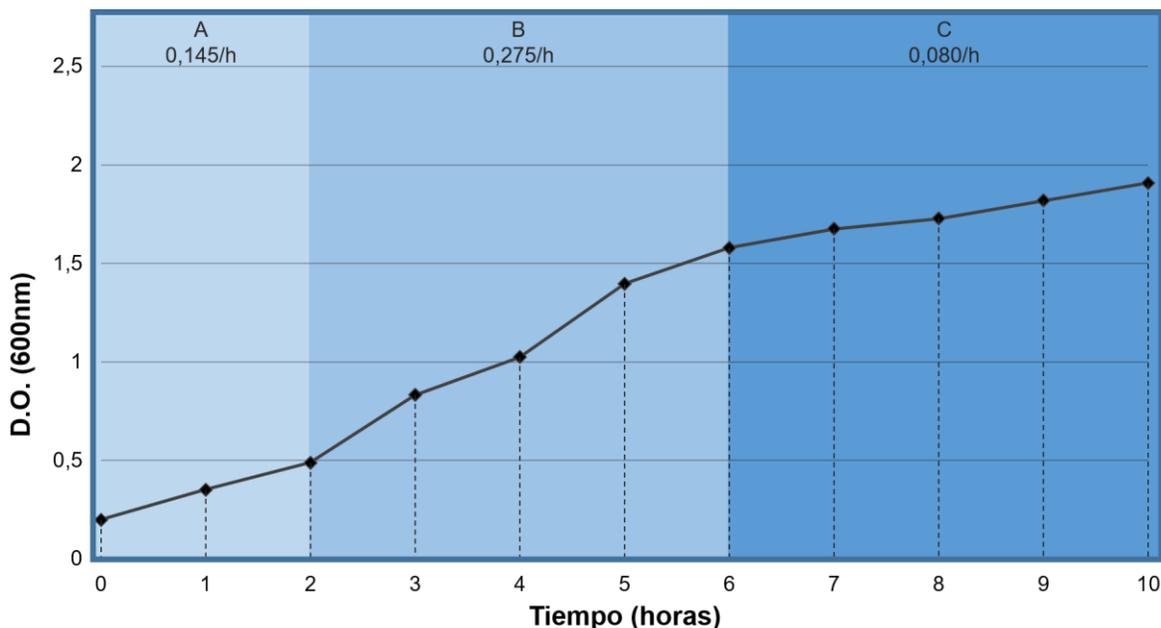


Figura 2. Curva de Crecimiento de *L. casei* ATCC 4646. Se muestran las velocidades de crecimiento de cada fase en el borde superior de cada sección. n=1. A: fase de latencia; B: fase exponencial; C: fase estacionaria.

Producción de autoinductor-2 por *Lactobacillus casei* ATCC 4646

Con el objetivo de determinar si *L. casei* ATCC 4646 es capaz de producir AI-2, así como sus niveles durante las distintas fases de la curva de crecimiento, se procedió a la detección de éste usando la cepa reportera *V. harveyi* ATCC BAA-1117, la cual produce bioluminiscencia en presencia de AI-2 (Ng y Bassler, 2009). Se cuantificó la actividad de AI-2 como unidades relativas de luminiscencia (U.R.L.), obteniendo así los resultados presentados en la Figura 3. Se puede apreciar que AI-2 está presente en todas las etapas de crecimiento de la bacteria, llegando a su máxima expresión al comienzo de la fase exponencial (1 a 2h), para luego mantenerse hasta el término de ésta, a las 5 h, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en las U.R.L. detectadas entre estos períodos de tiempo (2h v/s 5h $p=0,379$; 4h v/s 5h $p=0,129$). Luego se observa que los niveles de AI-2 comienzan a decrecer, de manera significativa (4h v/s 6h $p=0,0308$), y luego de manera mayor al avanzar en la fase estacionaria (9-10 h) (1h v/s 9h $p=0,005$).

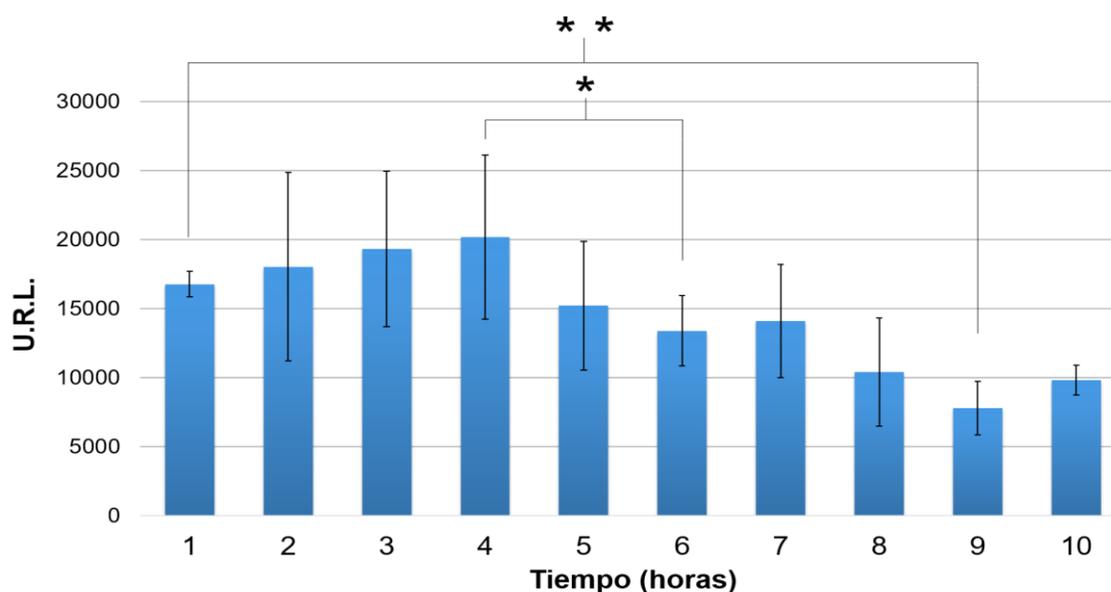


Figura 3. Cuantificación de luminiscencia producida por *V. harveyi* ATCC BAA-1117 al ser expuesto a sobrenadantes de cultivos de *L. casei* ATCC 4646 en diferentes fases de la curva de crecimiento. U.R.L.: unidades relativas de luminiscencia. * indica $p < 0,05$; ** indica $p \leq 0,005$.

Adhesión de *Lactobacillus casei* ATCC 4646 y efecto de autoinductor-2

Con la finalidad de determinar el efecto de AI-2 en la adhesión de *L. casei* ATCC 4646, se realizó un cultivo tal como se describe en la metodología. Por medio del ensayo MTT, se pudo observar cualitativamente la capacidad de adhesión, por la intensidad de la coloración en cada grupo, como se aprecia en la Figura 4. La intensidad del color indica la presencia de bacterias vivas adheridas a la superficie, debido a que el ensayo solo tiñe bacterias viables y en proliferación. En la Figura se ve al grupo con *L. casei* solo (A) y al grupo blanco sin *L. casei* (D) con baja intensidad de color, lo que indica que no hay bacterias adheridas. En cambio, el grupo de *L. casei* con sobrenadante (B) presenta una mucho mayor intensidad, seguido por el grupo de *L. casei* con DPD (C).

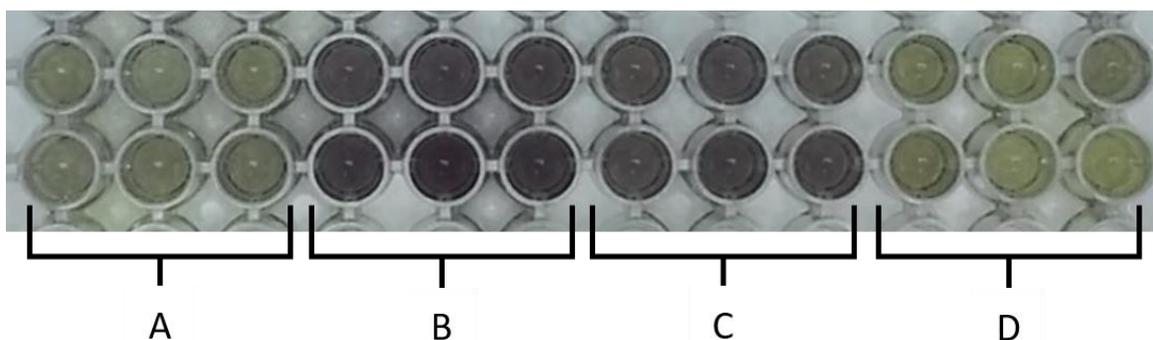


Figura 4. Fotografía del resultado del ensayo de adherencia. Se aprecia las diferencias de color entre los grupos experimentales, que indica la presencia de bacterias vivas adheridas en proporcionalidad directa con la intensidad del color. A: grupo con *L. casei*; B: grupo con *L. casei* y sobrenadante; C: grupo con *L. casei* y DPD; D: grupo blanco.

El análisis de los resultados del ensayo de adherencia se presenta en la Figura 5, donde se observa una mayor adhesión del grupo experimental con un sobrenadante de *L. casei* que contiene AI-2 (Figura 5, columna B), seguido del grupo experimental con DPD (columna C), en contraste al grupo que contiene solo *L. casei* (columna A). Cuando *L. casei* se incubó sin estímulo (columna A)

presentó valores de absorbancia similar al control sin *L. casei* (columna D), lo que indica que la adhesión de bacterias fue prácticamente nula en ausencia de autoinductor.

Se logró encontrar un efecto positivo significativo en la adhesión de *L. casei* en presencia del sobrenadante ($P < 0,00001$) y de DPD ($P = 0,0024$), siendo significativamente mayor en el grupo con sobrenadante respecto al grupo con DPD ($P < 0,00001$).

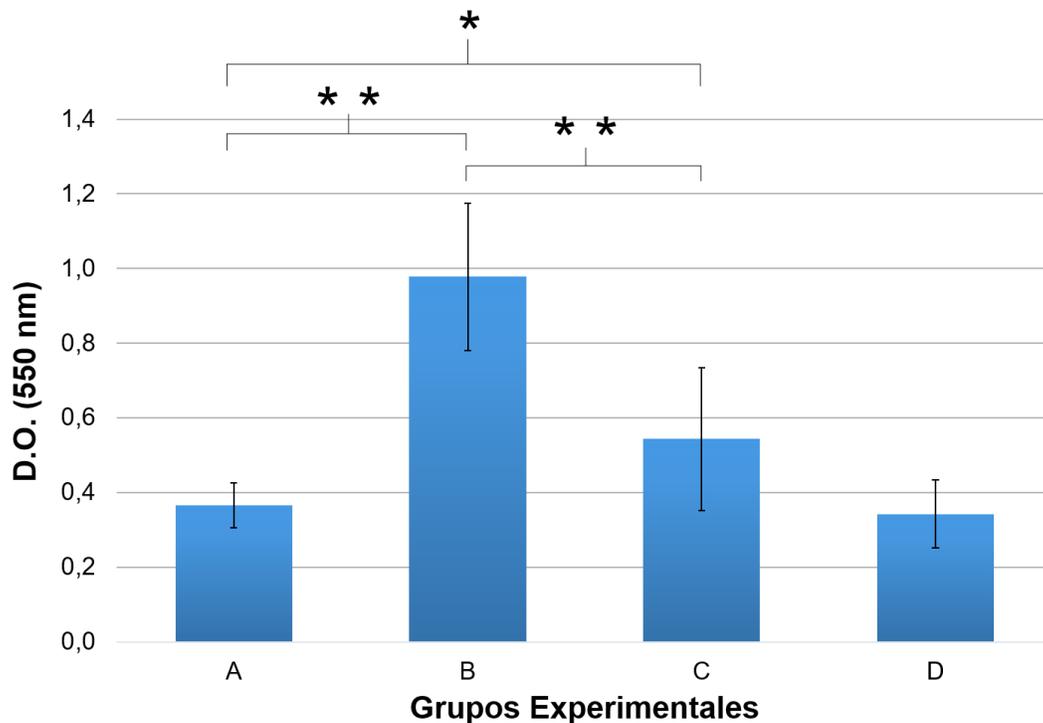


Figura 5. Análisis de adherencia de *L. casei* ATCC 4646 a superficie sólida. A: cultivo de *L. casei*; B: cultivo de *L. casei* con sobrenadante; C: cultivo de *L. casei* con DPD; D: grupo blanco, es decir, solo medio de cultivo y agua, sin *L. casei*. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,00005$.

Formación de Biopelícula de *Lactobacillus casei* ATCC 4646

Con el objetivo de evaluar el efecto de AI-2 en la formación de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646, se cultivó sobre cubreobjetos de vidrio previamente embebidos en saliva, tal como se indica en la sección metodología.

En la Figura 6 se observa las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En la biopelícula de *L. casei* en ausencia de DPD (Figura 6A), se observa que hay adherencia de algunas bacterias a la superficie, así como agregación bacteriana. En aquella biopelícula con adición de DPD (Figura 6B), se observa cualitativamente una mayor cantidad de bacterias adheridas y agregación bacteriana aparentemente más grande y numerosa, junto con un leve incremento en la formación de matriz de exopolisacáridos, que se aprecia como una sustancia amorfa adherida a las bacterias.

Además, es posible observar que, en ambos casos, *L. casei* mantiene su forma celular característica de bastón, lo que indica que DPD no afecta negativamente el tamaño, crecimiento o división celular.

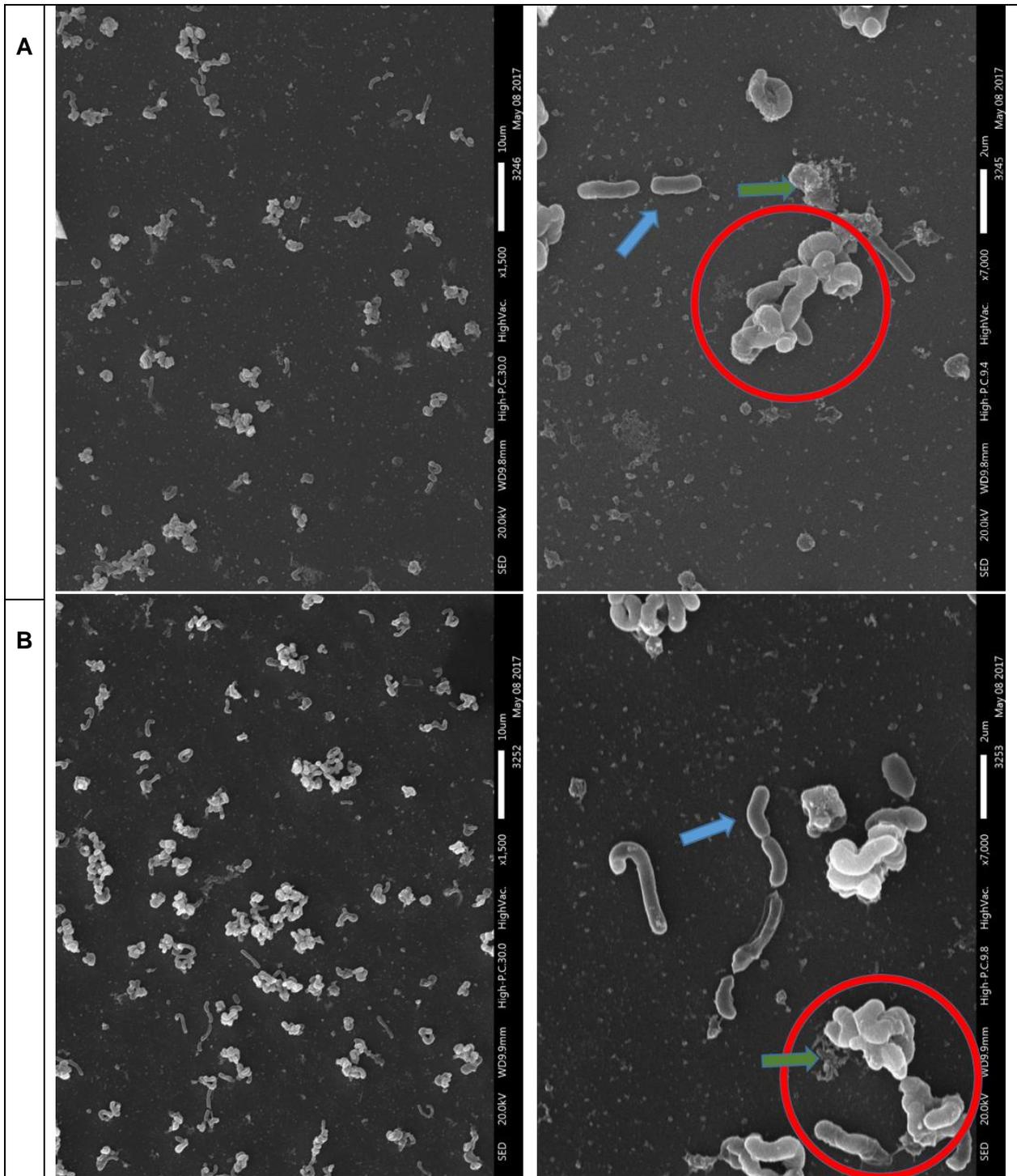


Figura 6: Fotomicrografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) de biopelículas de *L. casei* ATCC 4646 sobre discos de vidrio embebidos con saliva a las 72 horas de incubación. Magnificación 1500X (columna izquierda) y 7000X (columna derecha). Fila A: *L. casei* en medio MRS más agua destilada; Fila B: *L. casei* en medio MRS más DPD. Flecha azul: bacteria adherida; Flecha verde: exopolisacáridos; Círculo rojo: agregación bacteriana.

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que el sistema de *quorum sensing* mediante autoinductor-2, es producido y secretado por *L. casei* ATCC 4646, influyendo positivamente en su capacidad de adhesión y de formación de biopelículas, confirmándose así la hipótesis planteada.

Para determinar la producción de AI-2 por *L. casei* ATCC 4646, así como sus niveles durante las diferentes fases de la curva de crecimiento, se realizaron cultivos de este microorganismo, y se tomaron sus sobrenadantes para la detección de AI-2. Gracias a los datos representados en la curva de crecimiento (Figura 2) se logró caracterizar el crecimiento de *L. casei* para luego correlacionar los datos del ensayo de detección de AI-2 con las distintas etapas de crecimiento de la bacteria, determinando el inicio de la fase exponencial desde las 2h de crecimiento y alcanzando el inicio de su fase estacionaria a las 6h de incubación. Estos resultados son similares a lo descrito por Takagi y cols. (2014), quienes analizaron el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii*, *L. paracasei* y *L. plantarum*, determinando que a las 6 h comienzan a entrar en su fase estacionaria, la cual se asienta a las 8 h.

Las alícuotas obtenidas durante la curva de crecimiento, se procesaron como se describe en la metodología, cultivando el sobrenadante obtenido con *V. harveyi* para cuantificar su bioluminiscencia. Con los datos obtenidos, representados en la Figura 3, se confirmó que *L. casei* ATCC 4646 cultivado en medio MRS modificado es capaz de producir AI-2, cuyos niveles son mayores al comenzar la fase exponencial, a las 2 h de crecimiento, manteniendo sus niveles de AI-2 durante prácticamente toda esta fase. Luego, los niveles de AI-2 comienzan a decaer al llegar a la fase estacionaria, pero sin dejar de estar presente. Es importante señalar que la metodología utilizada permite detectar AI-2 presente en el medio, sin embargo, no permite determinar la tasa de producción de éste. En este contexto, es posible que el AI-2 detectado en la fase estacionaria, por ejemplo, sea debido a AI-2 residual producido en las fases anteriores, o bien que su tasa de producción no haya disminuido y que el decaimiento de sus niveles

sea debido a su utilización. Aun así, se puede afirmar que independiente de la fase de crecimiento en que se encuentre la bacteria, hay presencia de AI-2. A la fecha, no existen estudios previos que reporten que *L. casei* ATCC 4646 produzca AI-2. Sin embargo, hay estudios que reportaron que *L. rhamnosus* GG es capaz de producir AI-2, el que alcanza su máxima expresión en la fase estacionaria, pero que también se encuentra siempre presente durante su crecimiento (Lebeer y cols., 2007; De Keersmaecker y cols., 2003).

Moslehi-Jenabian y cols. (2007) reportaron que la producción de AI-2 está directamente relacionada con el estrés ácido en otras especies de *Lactobacillus*, al disminuir el pH del medio, sin embargo, esto no ha sido investigado en *L. casei*. Sería importante investigar si existió una baja en el pH del medio durante las primeras fases de crecimiento y si esto podría afectar en mayor medida la producción de AI-2 en las fases finales de cultivo.

Una vez confirmada la producción de AI-2 por *L. casei*, se procedió a determinar si efectivamente su adhesión se veía favorecida por la presencia de esta molécula. Para esto se usó el ensayo MTT, el cual es capaz de detectar bacterias vivas adheridas, logrando discriminar entre bacterias viables y bacterias muertas residuales. En este ensayo, se utilizaron 4 grupos experimentales. El primero consistió en un cultivo de *L. casei* en saliva humana como control. El segundo grupo fue un cultivo de *L. casei* en saliva humana donde se agregó sobrenadante de un cultivo previo de *L. casei* que contenía AI-2. En el tercer grupo se cultivó *L. casei* en saliva humana, agregando además DPD comercial. El cuarto grupo consistió en medio MRS con saliva humana como blanco.

Se utilizó DPD, una molécula que se cicla espontáneamente formando AI-2, para determinar con mejor precisión su efecto en la adhesión de *L. casei*. El objetivo de incluir un grupo con un sobrenadante de un cultivo de *L. casei* que contiene AI-2, entre otros compuestos secretados por la bacteria, fue determinar si existían además otros factores diferentes a AI-2, producidos por *L. casei*, que influyeran en su adhesión.

Se logró encontrar un efecto positivo significativo en la adhesión de *L. casei* en presencia del sobrenadante ($P < 0,00001$) y de DPD ($P = 0,0024$), siendo significativamente mayor en el grupo con sobrenadante respecto al grupo con DPD ($P < 0,00001$), indicando que si bien AI-2 favorece la adhesión a superficies, no es el único elemento responsable y existen otros factores involucrados.

Haddaji y cols. (2015), estudiaron dos cepas de *L. casei* diferentes a la usada en nuestro estudio, encontrando que a bajo pH *L. casei* cambia las propiedades de su membrana, aumentando la proporción de ácidos grasos saturados versus los insaturados, y disminuyendo significativamente su adhesión a superficies. Aunque no encontraron relación significativa entre los cambios en la membrana y la adhesión a superficies, sus resultados indican que el pH del medio podría estar afectando, mediante otros mecanismos, la adhesión a superficies. Sin embargo, Moslehi-Jenabian y cols. (2007) encontraron que *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* aumentaban la transcripción del gen *luxS* y la secreción de AI-2 a medida que bajaba el pH del medio, siendo atenuado en células ya adaptadas al estrés ácido. Esto indica que se requieren futuras investigaciones para determinar si en *L. casei*, cambia la actividad de AI-2 dependiendo del pH del medio, y si esto altera su adhesión a superficies.

Yeo y cols. (2015), analizaron la influencia de distintos tipos de estrés gastrointestinales en la actividad de AI-2 en *L. rhamnosus* y *L. plantarum*. En el estudio, compararon *in vitro* la adhesión de ambas cepas a células epiteliales intestinales de cerdo, usando AI-2 purificado y un inhibidor de AI-2. Encontraron un aumento en la adhesión en presencia de AI-2 en ambas cepas, y una disminución en la adhesión y en la expresión del gen *luxS* en presencia del inhibidor de AI-2. Esto también se condice con lo encontrado en nuestro estudio, indicando que AI-2 tiene un rol en la adhesión a superficies.

Buck y cols. (2009) estudiaron el efecto de AI-2 en la adhesión de *L. acidophilus*, utilizando una cepa mutante del gen *luxS* que no producía AI-2. Notaron una disminución del 58% en la adhesión a células epiteliales intestinales *in vitro* en comparación al control. Esto se condice con lo encontrado por nuestro

estudio, en donde la presencia de altas cantidades de AI-2 aumentó la adhesión a superficies *in vitro*.

Por medio del ensayo de formación de biopelícula, se obtuvieron imágenes de microscopía de barrido para analizar la formación de biopelícula de *L. casei*. A través de un análisis visual cualitativo, se puede ver que hay un aumento en la cantidad de bacterias adheridas a la superficie, agregación bacteriana y formación de matriz de exopolisacáridos en el grupo con DPD (Figura 6). Esto indica que hay una tendencia a formar biopelículas monoespecie con mayor intensidad cuando hay mayores niveles de AI-2. Sin embargo, Rickard y cols., (2006) describen en *S. oralis* y *A. naeslundii*, que sobre y bajo cierta concentración de AI-2, se puede inhibir la capacidad de formar biopelículas. Sería interesante evaluar cómo afecta la concentración de AI-2 en la capacidad de *L. casei* de formar biopelículas. Además, aún queda por determinar si este efecto ocurre en biopelículas multiespecie, que es la condición natural en que se encuentran las bacterias de la biopelícula dental. No existen estudios previos que evalúen el efecto de AI-2 en la formación de biopelículas multiespecie con *L. casei*.

El presente estudio planteó como hipótesis que el sistema de *quorum sensing* mediado por autoinductor-2 funcional está presente en *L. casei* ATCC 4646, promoviendo su adhesión y formación de biopelículas.

Luego de analizar los resultados obtenidos en general, es posible afirmar que la presencia de AI-2 favorece la adhesión y formación de biopelícula de *L. casei* ATCC 4646, ya que se aprecia un aumento significativo en su capacidad de adhesión a superficies y un aumento en la capacidad de formación de biopelícula en presencia de AI-2.

De acuerdo con esto, se valida la hipótesis planteada en esta investigación.

CONCLUSIONES

En este estudio se analizó si *L. casei* ATCC 4646 posee un sistema de *quorum sensing* mediado por AI-2 funcional, y si éste participa en su capacidad de adhesión y de formación de biopelículas, lo cual no ha sido descrito previamente para esta bacteria, determinando que:

- *Lactobacillus casei* ATCC 4646 es capaz de producir AI-2 funcional al medio externo.
- La adhesión de *Lactobacillus casei* ATCC 4646 a superficies se ve favorecida en presencia de AI-2.
- La formación de biopelículas mono especie de *Lactobacillus casei* ATCC 4646 se ve favorecida en presencia de AI-2.

En conclusión, *L. casei* ATCC 4646 posee un sistema de *quorum sensing* mediado por AI-2 funcional, que actúa sobre este microorganismo aumentando su capacidad de adhesión a superficies y formación de biopelículas.

Estos resultados permiten deducir que este sistema puede favorecer la permanencia de esta bacteria en lesiones de caries.

SUGERENCIAS

Se sugiere investigar a futuro en *L. casei* la relación de la variación de pH en el medio con la actividad de AI-2 y el gen *luxS* y la adhesión a superficies. También se sugiere investigar el efecto de AI-2 en la capacidad de *L. casei* de formar biopelículas multiespecies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas J., Griffen A., Darlis S., Lee A., Olsen I., Dewhirst F., Leys E. y Paster B. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46:1407-1417.
- Almståhl A., Lingström P., Eliasson L. y Carlén A. (2012). Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque *Lactobacillus* strains. *Clin Oral Invest* DOI 10.1007/s00784-012-0832-z.
- Bowen W., Burne R., Wu H. y Koo H. (2017). Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol* 26:229-242.
- Buck B., Azcarate-Peril M. y Klaenhammer T. (2009). Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 107:269-279.
- Byun R, Nadkarni M, Chhour K, Martin F, Jacques N. (2004) Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Journal of clinical microbiology* 42: 3128–3136.
- Caufield P.W., Li Y., Dasanayake A. y Saxena D. (2007). Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Res* 41:2-8.
- Cuadra-Saenz G., Rao D., Underwood A., Belapure S., Campagna S., Sun Z., Tammariello S. y Rickard A. (2012). Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing streptococci in oral biofilms. *Microbiol* 158:1783-1795.
- Dong Y., Pearce E., Yue L., Larsen M., Gao X. y Wang J. (1999). Plaque pH and associated parameters in relation to caries. *Caries Res* 33:428-436.
- Euzéby J. y Parte A., List of prokaryotic names with standing in nomenclature, <http://www.bacterio.net> (27 de Agosto de 2016).
- Haddaji N., Khouadja S., Fdhila K., Krifi B., Ben Ismail M., Lagha R., Bakir K. y Bakhrouf A. (2015). Acid stress suggests different determinants for polystyrene and HeLa cell adhesion in *Lactobacillus casei*. *J Dairy Sci* 98:4302-4309.
- Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T. y Maeda N. (2009). Bacterial Interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88:982-990.
- De Keersmaecker S. y Vanderleyden. J. (2003). Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology* 149:1953–1956
- Kianoush N., Adler C., Nguyen K., Browne G., Simonian M. y Hunter N. (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *Plos One* 9: e92940.
- Klander O. y Weiss N. (1986) Genus *Lactobacillus*. In: Sneath P., Mair N., Sharpe M., Holt J., editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th edition. Baltimore (MD): Williams & Wilkins. P. 1063-1065.

- Klein H., Palmer C. y Knutson J. (1938). Studies on dental caries, I, dental status and dental needs of elementary school. *Pub Health Rep* 53:751-765.
- Leeber S., De Keersmaecker S., Verhoeven T., Fadda A., Marchal K. y 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.
- Lima K., Coehlo L., Pinheiro I., Rocas I. y Siqueira J. Jr. (2011). Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res* 45:21-30.
- Luzanto Claudia. (2016). Resistencia a ácido e identificación de aislados clínicos de *Lactobacillus* spp. de la cavidad oral de niños de 7 a 11 años sin experiencia de caries versus con caries dentinarias profundas. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
- Marchant S., Brailsford S., Twomey A., Roberts G. y Beighton D. (2001). The Predominant Microflora of Nursing Caries Lesions. *Caries Res* 35:397-406.
- Matsui R. y Cvitkovitch D. (2010). Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol* 5:403–417.
- McNab R., Ford S., El-Sabaeny A., Barbieri B., Cook G. y Lamont R. (2003). LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 185:274–284.
- Messaoudi S., Manai M., Kergourlay G., Prevost H., Connil N., Chobert J. y Dousset X. (2013). *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol* 36:296-304.
- MINSAL 2011. Metas 2011-2020, Elige vivir sano. Estrategia Nacional de Salud para el cumplimiento de los objetivos sanitarios de la década 2011-2020. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.
- Moslehi-Jenabian S, Gori K, Jespersen L. (2009). AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. *Int J Food Microbiol* 135:295–302.
- Nancy J. y Dorignac G. (1992). Lactobacilli from the dentin and saliva in children. *J Clin Pediatr Dent* 16:107-11.
- Ng W. y Bassler B. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43:197-222.
- Pereira C., Thompson J. y Xavier K. (2013). AI-2 mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 37:156-181.

- 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.
- Piwat S., Teanpaisan R., Thitasomakul S., Thearmontree A. y Dahlén G. (2010). *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol Oral Microbiol* 25:157-164.
- Piwat S., Teanpaisan R., Dahlen G., Thitasomakul S. y Douglas C. (2012). Acid production and growth by oral *Lactobacillus* species *in vitro*. *J Inv Clin Dent* 3:56-61.
- Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (1999) Microbiología. 4ª edición. McGraw-Hill Interamericana.
- Preza D., Olsen I., Willumsen T., Boches S., Cotton S., Grinde B. y 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 R., Blehert D., Campagna S., Semmelhack M., Eglund P., Bassler B. y Kolenbrander P. (2006). Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol* 60:1446–1456.
- Saulnier D., Kolida S. y Gibson G.R. (2009). Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Curr Pharm Des* 15:1403-1414.
- Selwitz R., Ismail A. and Pitts N. (2007). Dental Caries. *Lancet* 369:51-59.
- Simón-Soro A. y Mira A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, Vol. 23, n°2.
- Takagi R., Tsujikawa Y., Nomoto R. y Osawa R. (2014). Comparison of the growth of *Lactobacillus delbrueckii*, *L. paracasei* and *L. plantarum* on Inulin in Co-culture systems. *Biosci Microbiota Food Health* 33:139–146.
- Takahashi N. y Nyvad B. (2011). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J Dent Res* 90:294-303.
- Tanzer J., Livingston J. y Thompson A. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 65:1028-1037.
- Van Houte J., Aasenden R. y Peebles T. (1981). Lactobacilli in human dental plaque and saliva. *J Dent Res* 60:2-5.
- Wen Z. y Burne R. (2004). LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *J Bacteriol* 186:2682-2691.

- Wen Z., Nguyen A., Bitoun J., Abranches J., Baker H. y Burne R. (2011). Transcriptome analysis of LuxS-deficient *Streptococcus mutans* grown in biofilms. *Mol Oral Microbiol* 26:2-18.
- Wolff D., Frese C., Maier-Kraus T., Krueger T. y Wolff B. (2013). 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. y Jenkinson H. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol* 28:83-101.
- Yeo S., Park H., Ji Y., Park S., Yang J., Lee J. Mathara J., Shin H. y Holzapfel W. (2015). Influence of gastrointestinal stress on autoinducer-2 activity of two *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Ecol* 91:fiv065.

ANEXOS

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
UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITÉ ÉTICO
CIENTIFICO

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Ed 28/12/2015

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, nulos 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

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.

ANEXO 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: _____

