

“Efecto de *Lactobacillus casei* ATCC 4646 sobre *Streptococcus sanguinis* SK36, mediado por el sistema *Quorum Sensing*”

Diego Hernández Delgado

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

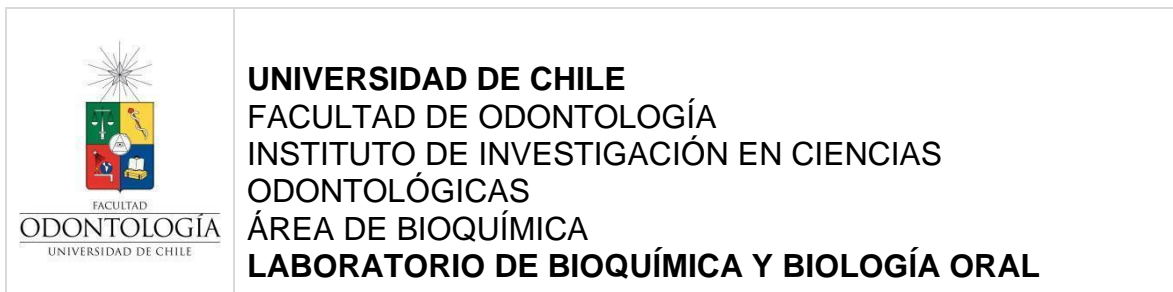
TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Carla Lozano Moraga

**Adscrito a Proyecto PRIODO 2021-14.
Santiago - Chile
2022**



“Efecto de *Lactobacillus casei* ATCC 4646 sobre *Streptococcus sanguinis* SK36, mediado por el sistema *Quorum Sensing*”

Diego Hernández Delgado

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Carla Lozano Moraga

**Adscrito a Proyecto PRIODO 2021-14.
Santiago - Chile
2022**

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

RESUMEN	8
1. MARCO TEÓRICO	9
1.1 Microbiota oral	9
1.2 Caries dental	9
1.3 <i>Streptococcus sanguinis</i> y Caries Dental	10
1.4 <i>Lactocaseibacillus</i> y Caries Dental	11
1.5 Comunicación en la biopelícula oral	13
1.6 <i>Quorum sensing</i> en bacterias orales	13
1.7 <i>Quorum sensing</i> y <i>Lactocaseibacillus</i>	15
1.8 <i>Quorum sensing</i> y <i>S. sanguinis</i>	16
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVO GENERAL	18
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	19
5.2 Detección de AI-2 producido por <i>L. casei</i> ATCC 4646 y <i>S. sanguinis</i> SK36	19
5.3 Ensayos de crecimiento de <i>S. sanguinis</i> SK36 en presencia de AI-2	20
5.4 Ensayos de adherencia de <i>S. sanguinis</i> SK36 en presencia de AI-2	20
5.5 Formación de biopelículas de <i>S. sanguinis</i> SK36 en presencia de AI-2	21
5.6 Análisis Estadísticos	22
6. RESULTADOS	23
6.1 Producción de AI-2 por <i>L. casei</i> ATCC 4646 y <i>S. sanguinis</i> SK36	23
6.2 Efecto de <i>L. casei</i> ATCC 4646 en el crecimiento de <i>S. sanguinis</i> SK36	24
6.3 Efecto de <i>L. casei</i> ATCC 4646 en la adhesión de <i>S. sanguinis</i> SK36	25

6.4 Efecto de <i>L. casei</i> ATCC 4646 en la formación de biopelícula de <i>S. sanguinis</i> SK36	26
7. DISCUSIÓN	27
7.1 Producción de AI-2 de <i>L. casei</i> ATCC 4646 y <i>S. sanguinis</i> SK36	27
7.2 Efecto de <i>L. casei</i> y AI-2 sobre el crecimiento de <i>S. sanguinis</i> SK36	28
7.3 Efecto de <i>L. casei</i> ATCC 4646 en la adhesión de <i>S. sanguinis</i>	29
7.4 Efecto de <i>L. casei</i> ATCC 4646 en la formación de biopelícula de <i>S. sanguinis</i>	29
8. CONCLUSIONES	31
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
10. ANEXOS Y APÉNDICES	38

RESUMEN

Introducción. En la boca habita un grupo heterogéneo de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias ácido-lácticas que son frecuentemente relacionadas a lesiones de caries. Entre estas especies encontramos a *Lacticaseibacillus casei*. Por otra parte, dentro de la microbiota endógena existen microorganismos asociados a salud, entre los cuales está *Streptococcus sanguinis*. Al estudiar la progresión de las lesiones de caries, se observó que *S. sanguinis* disminuye en lesiones de caries profundas y *L. casei* aumenta. Ambas bacterias poseen un mecanismo de comunicación denominado *quorum sensing* mediado por la molécula autoinductor-2 (AI-2), y se describe que a través de este sistema los microorganismos pueden modificar su expresión génica. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de *L. casei* ATCC 4646 a través de autoinductor-2 en el crecimiento, la adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36.

Metodología. Para el estudio se utilizaron las cepas de *L. casei* ATCC 4646 y *S. sanguinis* SK36. Se analizó la presencia de AI-2 producido por *L. casei* ATCC 4646 mediante el ensayo con la cepa reportera *Vibrio harveyi* BAA-1117. El análisis de crecimiento de *S. sanguinis* SK36 se realizó mediante el cultivo de 8 h en medio BHI a 37°C en 5% CO₂. Para el estudio de adherencia de *S. sanguinis* se utilizó el ensayo MTT (Sigma®). Para el análisis de formación de biopelículas se utilizó tinción con cristal violeta. Los tres ensayos fueron realizados en presencia de sobrenadante libre de células (SLC) de cultivos de *L. casei* ATCC 4646 (silvestre y mutante *luxS*⁻) y AI-2 sintetizado químicamente.

Resultados. Se observó que el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36 no varían significativamente en presencia de los SLC de *L. casei* ATCC 4646 (silvestre y mutante *luxS*⁻), así como tampoco de AI-2 sintetizado químicamente.

Conclusiones. *L. casei* ATCC 4646 no posee efecto mediante AI-2 en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36. Por otra parte, AI-2 sintetizado químicamente tampoco influyó estas funciones en este microorganismo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Microbiota oral

La cavidad oral es uno de los sitios del cuerpo humano mayormente poblado con microorganismos, y se describe que alberga alrededor de 700 especies, las que en conjunto forman la microbiota oral (Guo y cols., 2014). El ambiente diverso de la cavidad oral promueve el establecimiento de esta microbiota en diferentes comunidades microbiológicas, las que pueden encontrarse a la forma planctónica, resuspendidas en la saliva, o formando biopelículas adheridas a superficies, como mucosas, paladar y dientes (Kolenbrander y cols., 2010). La biopelícula que se establece sobre los dientes se denomina biopelícula dental.

En estados de salud oral, las comunidades microbianas son capaces de mantener un equilibrio ecológico, a través de interacciones competitivas y cooperativas entre especies iguales o diferentes de microorganismos (Guo y cols., 2014). Cuando se rompe este equilibrio ecológico se produce una disbiosis, generando una alteración cuantitativa y cualitativa en la microbiota oral. Numerosos estudios han indicado que, en estas condiciones, la microbiota oral es responsable de las principales enfermedades orales: la periodontitis y la caries dental.

1.2 Caries dental

La caries dental corresponde a una enfermedad multifactorial y dinámica, no transmisible, provocada por la interacción entre la estructura dentaria, la biopelícula microbiana formada en la superficie del diente y la presencia de azúcares fermentables; también juega un papel importante la influencia salival y genética del hospedero (Pitts, 2017). Estos procesos se manifiestan como un proceso dinámico natural de desmineralización-rem mineralización.

La desmineralización sucede a un pH bajo (menor a 5,5), cuando el medio ambiente oral es bajo en saturación de iones minerales en relación con el contenido mineral del diente. La remineralización es la ganancia de mineral que se produce por los depósitos de iones dentro de los tejidos desmineralizados del

diente. Este fenómeno consiste en el reemplazo de los minerales que el diente ha perdido previamente y su consecuente reparación (Carrillo, 2010).

En la microbiota oral de un individuo sano podemos encontrar los principales microorganismos cariogénicos, los cuales, cuando el pH es neutro, se encuentran en menor prevalencia y solo ocupan una pequeña parte de la biopelícula. Frente a un consumo frecuente de azúcares fermentables, estos microorganismos pueden producir elevados niveles de ácidos, alterando la homeostasis del medio. Se generan periodos prolongados bajo el pH crítico de desmineralización del esmalte y la dentina (pH 5,5) y el ciclo de desmineralización/remineralización se inclina hacia una pérdida neta de mineral y, además, condiciona a una selección de microorganismos acidogénicos (productores de ácidos) y acidúricos (resistentes y funcionales en un ambiente ácido), dentro de los que se encuentran algunas especies del género *Lactobacillus*. Por otra parte, las especies asociadas al esmalte sano, como *Streptococcus sanguinis*, son más sensibles y poco tolerantes a las condiciones ambientales ácidas (Marsh, 2003; Grigaluskienė y cols., 2015). Se genera entonces, disbiosis en la biopelícula dental, con importantes cambios en su composición microbiana (Tanner y cols., 2018).

1.3 *Streptococcus sanguinis* y Caries Dental

En la cavidad oral, *S. sanguinis*, anaerobio facultativo Gram positivo, es miembro de la microbiota endógena del ser humano. Es considerado uno de los principales colonizadores primarios asociados a salud, por lo que juega un rol importante en el inicio de la formación de la biopelícula dental (Figueroa, 2009). *S. sanguinis* tiene la capacidad de secretar agentes antimicrobianos, como proteínas y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que tendrían efectos inhibitorios sobre algunos patógenos periodontales, como *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, y también sobre células fúngicas del tipo levaduras como *Candida albicans* (Nobbs y cols., 2009).

S. sanguinis ha sido mayoritariamente recuperado desde cavidad oral de niños y adultos libres de caries (Ge y cols., 2008; Giacaman y cols., 2015; Agnello y cols.,

2017). Ge y cols. (2008) analizaron la colonización de *S. mutans* y *S. sanguinis* en cavidad oral y su asociación con caries temprana de la infancia, determinando que existe una relación inversa en los niveles de ambos microorganismos, asociada al estatus de caries de los infantes. Encontraron menores recuentos de *S. sanguinis*, y mayores de *S. mutans*, en los portadores de lesiones severas, y viceversa. Giacaman y cols. (2015) realizaron un análisis similar en adultos, encontrando que los recuentos de *S. sanguinis* eran significativamente mayores en individuos libres de caries que en aquellos que poseían lesiones.

Al estudiar la progresión de las lesiones de caries, se observó que la presencia de *S. sanguinis* disminuye en lesiones de caries profundas y, otras especies bacterianas se encuentran aumentadas, tales como *Lacticaseibacillus casei* (Figuroa, 2009).

1.4 *Lacticaseibacillus* y Caries Dental

En la boca existe un grupo heterogéneo de microorganismos, donde podemos encontrar bacterias ácido-lácticas (BAL) que son frecuentemente relacionadas con la fermentación de los carbohidratos, produciendo ácido láctico como principal producto final (Selwitz y cols., 2007). Entre las especies de bacterias ácido-lácticas se encuentran los miembros del género *Lacticaseibacillus*. Estos pertenecían originalmente al género *Lactobacillus*, el cual, debido a los avances en secuenciación de genomas, fue re-estructurado taxonómicamente, dando origen a 25 géneros diferentes, entre los que se encuentran *Lacticaseibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lactiplantibacillus* y un nuevo género *Lactobacillus* (Zheng y cols., 2020).

Lacticaseibacillus corresponden a bacterias Gram positivo homofermentativas, carentes de motilidad, anaeróbicas estrictas o facultativas, acidogénicas y acidúricas (Zheng y cols., 2020).

Algunas especies de *Lacticaseibacillus* juegan un papel fundamental en el ecosistema oral, tanto en salud como en enfermedad. Colonizan la cavidad oral durante los primeros años de vida y se pueden encontrar en grandes cantidades

en la saliva, dorso de la lengua, mucosas, paladar duro y en menor medida en las superficies dentarias (Badet y Thebaud, 2008). En estudios en individuos sanos se pudo observar que *L. rhamnosus* tenía mayor predominancia en las encías y *L. casei* en lengua (Badet y Thebaud, 2008). Algunas de ellas son ampliamente reconocidas como microorganismos cariogénicos, ya que son frecuentemente encontradas en lesiones de caries dentinarias profundas (Marchant y cols., 2001; Klinke y cols., 2009; Callaway y cols., 2013; Kianoush y cols., 2014; Damé-Teixeira y cols., 2021).

En un estudio realizado por Marchant y cols. (2001), se analizó las especies de BAL predominantes en dentina cariada de niños preescolares, siendo las más frecuentemente encontradas *Lacticaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus fermentum* y *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Por otro lado, Callaway y cols. (2013), identificaron diversas especies de BAL aisladas desde muestras de lesiones de caries dentinarias en molares temporales, dentro de las cuales encontraron *L. casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *L. rhamnosus*. Estos autores también detectaron que luego de la remoción de la dentina infectada, el recuento de BAL en la dentina afectada subyacente se reducía considerablemente.

Estudios de la microbiota presente en lesiones de caries ha revelado que la diversidad bacteriana asociada a lesiones de caries profundas es mucho menor que aquella asociada a superficies dentales sanas o a lesiones de poca profundidad (Kianoush y cols., 2014). Dentro de los microorganismos que son desplazados en lesiones de caries se encuentra *S. sanguinis*, y, por otra parte, *L. casei* aparece como uno de los más abundantes en esta condición (Kianoush y cols., 2014). Considerando que ambos microorganismos coexisten en la cavidad oral, y que utilizan el mismo nicho ecológico en la biopelícula dental, es interesante analizar si poseen la capacidad de establecer una comunicación entre ellos, y qué efectos puede tener ésta sobre su colonización oral.

1.5 Comunicación en la biopelícula oral

La gran diversidad de la microbiota oral promueve el establecimiento de comunidades bacterianas. Estos habitantes han co-evolucionado, no solo con el hospedero, sino también entre sí, lo que ha dado lugar a una amplia comunicación intercelular entre especies. El equilibrio ecológico de esta comunidad se mantiene a través de interacciones competitivas y cooperativas (Guo y cols., 2014).

Por una parte, se ha descrito que existe la comunicación metabólica, donde la secreción de un metabolito por un microorganismo se puede utilizar como nutriente por un microorganismo diferente, o bien, la degradación de sustratos por enzimas extracelulares de un microorganismo crea disponibilidad biológica de sus subproductos para otros microorganismos (Wright y cols., 2013).

Por otro lado, pueden interaccionar competitivamente, por la presencia de 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.

1.6 Quorum sensing en bacterias orales

El quorum sensing es un proceso de comunicación entre microorganismos que permite que coordinen su expresión génica (Ng & Bassler, 2009; Kareb & Aïder, 2020).

Los microorganismos producen intracelularmente, secretan y censan pequeñas moléculas denominadas autoinductores. Cuando la concentración extracelular de autoinductores alcanza el umbral requerido para la detección, los receptores en las células (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 facilitando el comportamiento adaptativo sincronizado (Kareb & Aïder, 2020).

En bacterias Gram positivo, se han descrito dos sistemas principales de *quorum sensing* (Rémy y cols., 2018). En el primero, se describen péptidos modificados que utilizan como autoinductores (AIP: AutoInducer Peptide), y cuya secreción es mediada por transportadores de membrana especializados. Los AIP están codificados genéticamente y, por lo tanto, cada especie bacteriana es capaz de producir señales peptídicas con secuencias únicas (Waters & Bassler, 2005; Novick & Geisinger, 2008; Rémy y cols., 2018). El receptor para estos autoinductores se encuentra unido a la membrana, el cual, al unirse la molécula de autoinductor, transduce la señal a través de una serie de eventos de fosforilación (Pereira y cols., 2013). Los péptidos autoinductores son específicos para la comunicación intra-especie, aunque se han reportado algunas excepciones en que pueden ser utilizados inter-especie (Rémy y cols., 2018).

El segundo sistema de señales es dependiente de una molécula llamada autoinductor-2 (AI-2), el cual es utilizado como vía de comunicación universal de bacterias Gram positivo y Gram negativo. Este es producido por la enzima LuxS, a partir de la conversión de S-ribosil-homocisteína (SRH) en homocisteína y 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), que se convierte espontáneamente en AI-2 (Trappetti y cols., 2011; Guo y cols., 2014; Rémy y cols., 2018). Como muestra la figura 1, la enzima LuxS forma parte del ciclo de metilo activado, el cual proporciona grupos metilo para la metilación de ADN, ARN, proteínas y otros sustratos. En esta reacción enzimática se genera como producto el precursor del grupo de moléculas de AI-2, 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD) (Redanz y cols., 2012).

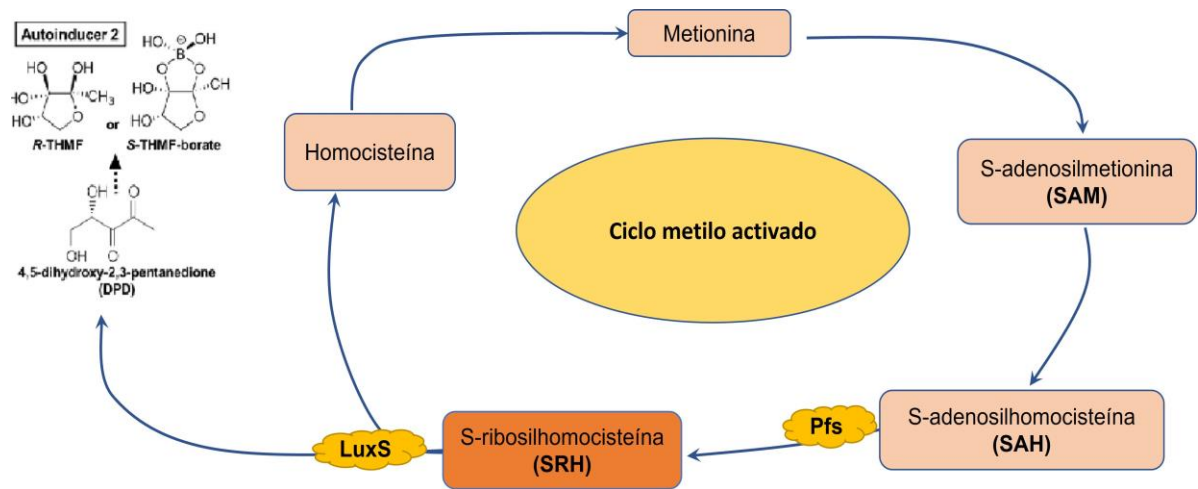


Figura 1. Esquema del ciclo del metilo activado y generación de AI-2. Un producto de la reacción catalizada por LuxS es DPD, el cual sufre una ciclación espontánea generando AI-2 (modificado desde Redanz y cols., 2012).

1.7 Quorum sensing y *Lacticaseibacillus*

Existen algunos estudios que describen la presencia de *quorum sensing* mediado por AI-2 en *Lacticaseibacillus*. Villarroel (2017) analizó la producción de AI-2 de *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646 aislado desde lesiones de caries, estableciendo que este microorganismo es capaz de producir esta molécula, alcanzando una concentración de 10-20 μM en el medio extracelular. Por otra parte, se observó que AI-2 presenta una influencia positiva en la formación y adhesión de biopelículas de este microorganismo.

Otro estudio realizado observó el efecto de AI-2 en la adhesión de *L. rhamnosus* a células epiteliales de intestino delgado. Se muestra que la capacidad de adhesión se ve potenciada por 30 μM de AI-2 adicionado exógenamente. Sin embargo, cuando la bacteria es tratada previamente en un modelo *in vitro* que simula su paso a través del tracto gastrointestinal, su capacidad de adhesión disminuye considerablemente en presencia de AI-2. Esto demostraría que la respuesta bacteriana de *L. rhamnosus* a AI-2, depende de las condiciones del medio en el que se desarrolla el microorganismo (Yeo y cols., 2015).

Por otro lado, se ha estudiado la interacción de *L. rhamnosus* con otros microorganismos. Do y cols. (2021) describieron el efecto de *L. rhamnosus* mediante *quorum sensing* a través de AI-2 sobre *H. pylori*, el cual generó un aumento en la capacidad de asociación de este microorganismo a células gastrointestinales.

1.8 Quorum sensing y *S. sanguinis*

En lo que respecta a *S. sanguinis*, se ha descrito que presenta 2 sistemas de comunicación mediados por *quorum sensing*. El primero corresponde a un sistema de competencia genética ComCDE, mediado por un péptido autoinductor (AIP), el cual genera modificaciones en el comportamiento principalmente a nivel de virulencia (Zhao y cols., 2018). El segundo está regulado por AI-2. Se describió que *S. sanguinis* es capaz de sintetizar y liberar AI-2 al medio ambiente, alcanzando un máximo de concentración de 2,9 μ M en la fase estacionaria temprana de crecimiento (Redanz y cols., 2012).

Además, en el estudio de Redanz y cols. (2012) se investigó la influencia de LuxS en el crecimiento bacteriano y formación de biopelículas de *S. sanguinis*, observándose que al suprimir el gen que codifica para LuxS se inhibió la producción de AI-2, disminuyendo significativamente la formación de biopelículas, no así el crecimiento bacteriano, que no presentó diferencias respecto al cultivo silvestre.

En este contexto, se ha señalado que los niveles a los cuales se encuentre AI-2 en el medio extracelular, son muy importantes para la comunicación inter-especies, más aún en el contexto de la cavidad oral (Kolenbrander y cols., 2010). Se ha determinado que los microorganismos comensales se comunican con bajos niveles de AI-2, y que elevados niveles de esta molécula son inhibidores de sus funciones celulares, como la formación de biopelículas (Rickard y cols., 2006; Kolenbrander y cols., 2010). Por otra parte, aquellos microorganismos relacionados con lesiones de caries como *S. mutans* y *L. casei*, producen y requieren cantidades de AI-2 mucho mayores para comunicarse y activar la

expresión de genes (He y cols., 2015; Villarroel, 2017).

En base a todos estos antecedentes, este estudio propuso que *L. casei* y *S. sanguinis* podrían establecer una comunicación interespecie en boca. Esta comunicación sería a través del mecanismo *quorum sensing*, específicamente a través de la molécula autoinductor-2. Esta comunicación podría ser desventajosa para *S. sanguinis*, generando su desplazamiento desde los sitios de caries, ya que *L. casei* produce al menos 5 veces mayor cantidad de AI-2.

De acuerdo con esto, este estudio propuso analizar el efecto de *L. casei* ATCC 4646 sobre el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36 a través de AI-2.

2. HIPÓTESIS

L. casei ATCC 4646, a través de autoinductor-2, genera un efecto negativo en el crecimiento, la adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36.

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de *L. casei* ATCC 4646 a través de autoinductor-2 en el crecimiento, la adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el crecimiento de *S. sanguinis* SK36 en presencia del autoinductor-2 generado por *L. casei* ATCC 4646.
- Determinar el efecto de AI-2 derivado de *L. casei* sobre la adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36.

5. METODOLOGÍA

Esta investigación corresponde a un estudio de tipo experimental (analítico y prospectivo). Se encuentra asociado al proyecto PRIODO 2021/14, aprobado por el Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) de Campus Norte, Universidad de Chile.

5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de referencia *L. casei* ATCC 4646 y *S. sanguinis* SK36 fueron sembradas en forma de estría por agotamiento y cultivadas en placas Petri con medio BHI (Infusión Cerebro Corazón, BD®), a 37°C durante 48 h en 5% CO₂, desde donde se aisló una colonia con asa estéril para inocular y cultivarlas en medio BHI líquido en las mismas condiciones. Además, se utilizó una cepa mutante de *L. casei* ATCC 4646 que es deficiente en la producción de AI-2 (*L. casei* ATCC 4646 *luxS*⁻), la cual se cultivó en medio BHI en las mismas condiciones.

La cepa reportera *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1117 fue crecida en medio AB (Autoinducer Bioassay), a 30°C en aerobiosis por 24 horas.

El crecimiento bacteriano de todas las cepas utilizadas en este estudio fue monitoreado por medición de la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda (DO₆₀₀), tal como se describe para microorganismos bacterianos (Madigan y cols., 2015).

5.2 Detección de AI-2 producido por *L. casei* ATCC 4646 y *S. sanguinis* SK36

Se determinó la presencia y se cuantificaron los niveles de AI-2 producido por *L. casei* ATCC 4646 (silvestre y mutante *luxS*⁻) y *S. sanguinis* SK36 mediante el sistema de ensayo reportero *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1117, el cual produce luminiscencia ante la presencia de autoinductor, tal y como se describe (Taga y Xavier, 2011). La detección se realizó utilizando el sobrenadante de los cultivos en medio líquido obtenidos a 24 h de crecimiento. Se obtuvo el sobrenadante libre de

células (SLC) centrifugando el cultivo por 10 min a 8000 g, neutralizando el pH con NaOH y filtrando mediante filtros de membrana con tamaño de poro 0,2 µm. Por otro lado, se creció la cepa reportera durante 48 h a 30 °C en medio AB, se lavó y re-suspendió en medio AB fresco a una DO₆₀₀ de 0,5 y se diluyó 1/1000. El sobrenadante previamente procesado de *L. casei* ATCC 4646 (silvestre y mutante *luxS*⁻) y *S. sanguinis* SK 36 se mezcló con la cepa reportera en proporción 1:9, respectivamente. Se midió la luminiscencia generada a 30°C cada 10 min por 6 h en un lector de placas Synergy System (Biotek®). Se cuantificó la actividad de AI-2 como unidades relativas de luminiscencia (U.R.L.).

5.3 Ensayos de crecimiento de *S. sanguinis* SK36 en presencia de AI-2

Se realizó el análisis de crecimiento de *S. sanguinis* SK36 en presencia de los sobrenadantes libres de células (SLC) de *L. casei* (silvestre y mutante *luxS*⁻) obtenidos en la sección 5.2, o AI-2 sintetizado químicamente. *S. sanguinis* SK36 fue cultivado en microplacas de poliestireno, desechables estériles, de 96 pocillos, en medio BHI a 37°C en 5% CO₂, sin agitación por 8 h, registrando el crecimiento por medición de la DO₆₀₀ en un lector de placas Synergy System (Biotek®) Se utilizó AI-2 sintetizado químicamente como control, a concentración 10 µM final, cantidad normalmente producida por *L. casei*, determinada en la sección 5.2.

5.4 Ensayos de adherencia de *S. sanguinis* SK36 en presencia de AI-2

Se determinó la adhesión de *S. sanguinis* durante la formación inicial de la biopelícula, después de 16 h de incubación, como describieron Redanz y cols., 2012. Se cultivó *S. sanguinis* SK36 hasta alcanzar la fase estacionaria, en base a curvas de crecimiento previamente determinadas en el laboratorio. Se recolectó mediante centrifugación, se lavó y re-suspendió en medio BHI fresco a una DO₆₀₀ final de 1,0. Las células re-suspendidas fueron inoculadas en placas de poliestireno de 96 pocillos previamente tratados con una mezcla de proteínas salivales obtenida desde 5 donantes sanos (adquirida en el proyecto Fondecyt 11150928 aprobado por Comité de Ética). El ensayo se realizó en triplicado. Cada pocillo contenía *S. sanguinis* SK36, en ausencia o presencia de los SLC de *L.*

casei (silvestre y mutante *luxS*⁻). Se utilizó AI-2 sintetizado químicamente como control, a las concentraciones normalmente producidas por *L. casei*, y determinadas en la sección 5.2. La incubación se realizó a 37°C sin agitación. Luego de este periodo de tiempo, el medio fue descartado y se lavaron tres veces los pocillos con suero fisiológico, NaCl 0,9% m/v (para remover células no adheridas). Se cuantificaron las células adherentes viables utilizando el ensayo MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolo] (Sigma®), donde se adicionó el reactivo a los pocillos y se incubó a 37°C durante 4 h en 5% CO₂. La adherencia fue monitoreada por medición de la densidad óptica a 550 nm de longitud de onda (DO₅₅₀). A mayor absorbancia, mayor cantidad de células viables adheridas al pocillo de la placa de poliestireno, ya que el reactivo solo es internalizado y transformado en formazán por células viables.

5.5 Formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36 en presencia de AI-2

La formación de biopelículas se evaluó en placas de poliestireno de 96 pocillos, en cuyos pocillos se realizó en primer lugar la formación de película salival adquirida (PSA) a partir de mezcla de saliva de 5 donantes sanos (obtenida en el proyecto Fondecyt 11150928 aprobado por Comité de Ética). Para la formación de la PSA, se adicionaron 200 µL de la mezcla de salivas a cada pocillo, y se agitó suavemente por 1 h, a temperatura ambiente, para permitir la adhesión de las proteínas salivales al fondo del pocillo. Una vez finalizada la incubación, se retiró la saliva del pocillo y se procedió a realizar el experimento de formación de biopelículas. Para esto, cultivos líquidos de *S. sanguinis* SK36, en fase de crecimiento estacionaria, fueron centrifugados a 4000 g por 10 min a 21°C, re-suspendidos en medio BHI fresco, y diluidos hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,0. Este cultivo fue colocado en los pocillos diluyendo 1:10 con medio BHI y la placa fue cultivada por 48 h a 37°C sin agitación en 5% CO₂, para permitir la formación de las biopelículas. El ensayo se realizó en presencia de SLC de *L. casei* (silvestre y mutante *luxS*⁻), o de AI-2 sintetizado químicamente. Una vez listas fueron teñidas mediante cristal violeta tal como se describe (Lemos, 2010), posteriormente se cuantificaron por medición de la densidad óptica a 550 nm (DO₅₅₀), mediante un equipo SynergyHT (Biotek®). Se utilizó este tipo de

tinción pues es capaz de atravesar la matriz de exopolisacáridos de la biopelícula, alcanzado las capas más profundas, a diferencia del reactivo MTT que puede presentar dificultades en este sentido. Por otra parte, se ha descrito que la detección con MTT en biopelículas bacterianas puede generar interpretaciones erróneas de los resultados, debido a los diferentes estados metabólicos en que se encuentran las bacterias en diferentes capas de las biopelículas (Grela y cols., 2018).

5.6 Análisis Estadísticos

Se realizaron 3 ensayos independientes para evaluar el crecimiento, la adhesión y la formación de biopelículas de *S. sanguinis*, cada uno de ellos por triplicado, obteniendo un $n=9$ para cada análisis. Para evaluar si existe diferencia estadísticamente significativa en los diferentes análisis, se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, resultando con distribución no paramétrica, por lo que se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró significancia estadística con un valor de $p<0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Producción de AI-2 por *L. casei* ATCC 4646 y *S. sanguinis* SK36

Con el objetivo de determinar los niveles de AI-2 producidos por *L. casei* y *S. sanguinis*, se analizó su presencia en los sobrenadantes libres de células de cultivos de ambos microorganismos. Se cuantificó la actividad de AI-2 como Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L.). En todos los sobrenadantes de cultivo fue posible detectar la presencia de AI-2 (Figura 2). En relación con la producción por parte de *L. casei* silvestre y *L. casei luxS⁻* se pudo observar que si bien ambos producen AI-2 en las condiciones analizadas en este estudio, existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Kruskall-Wallis, $p=0,003$). Por otro lado, los sobrenadantes de *S. sanguinis* presentan niveles menores de AI-2 en comparación a los sobrenadantes de *L. casei*.

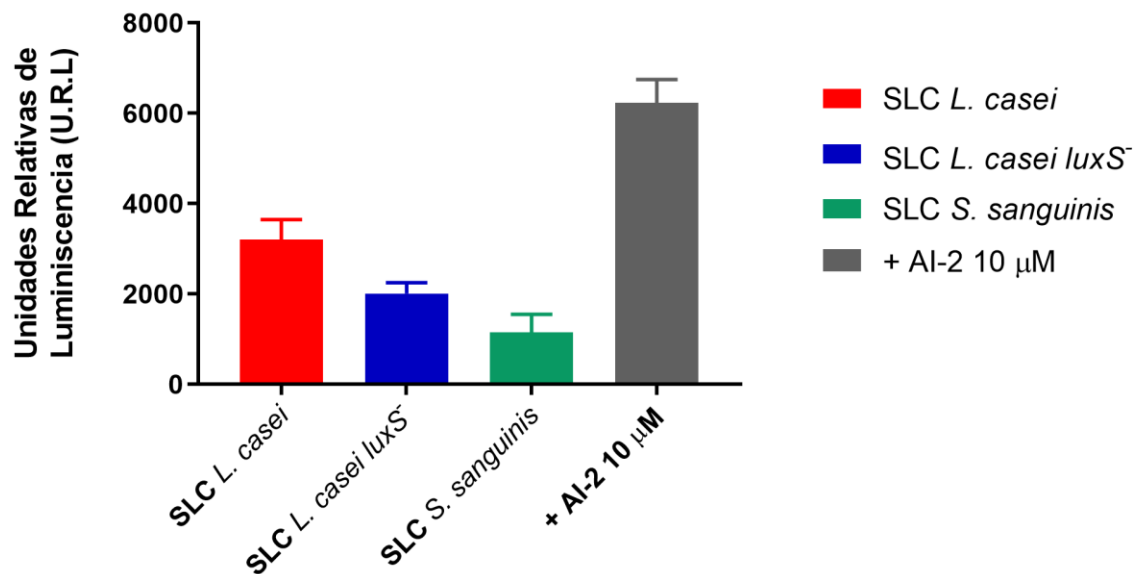


Figura 2. Análisis de producción de AI-2 por *L. casei* ATCC 4646 y *S. sanguinis* SK36. Todos los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas, cada una en triplicado ($n=9$).

En base a los resultados de este análisis, se determinó las concentraciones de AI-2 presente en los diferentes grupos. En el SLC del cultivo de *L. casei* se determinó una concentración de 5,13 μM de AI-2, mientras que en el SLC del cultivo de *L. casei luxS⁻* fue de 3,22 μM . Por otro lado, en el SLC de *S. sanguinis* se obtuvo 1,84 μM de AI-2.

6.2 Efecto de *L. casei* ATCC 4646 en el crecimiento de *S. sanguinis* SK36

Con la finalidad de determinar el efecto de *L. casei* y AI-2 sobre el crecimiento de *S. sanguinis*, se estudió éste en presencia y ausencia del SLC de *L. casei* y de AI-2 incorporado exógenamente, obteniéndose los resultados presentados en la Figura 3. Se analizó el crecimiento bacteriano a las 8 h, donde se puede observar que no existe diferencia estadísticamente significativa al comparar el control positivo de *S. sanguinis* SK36 con los grupos de estudio que poseen el SLC de *L. casei* (silvestre y mutante *luxS⁻*) y AI-2 sintetizado químicamente.

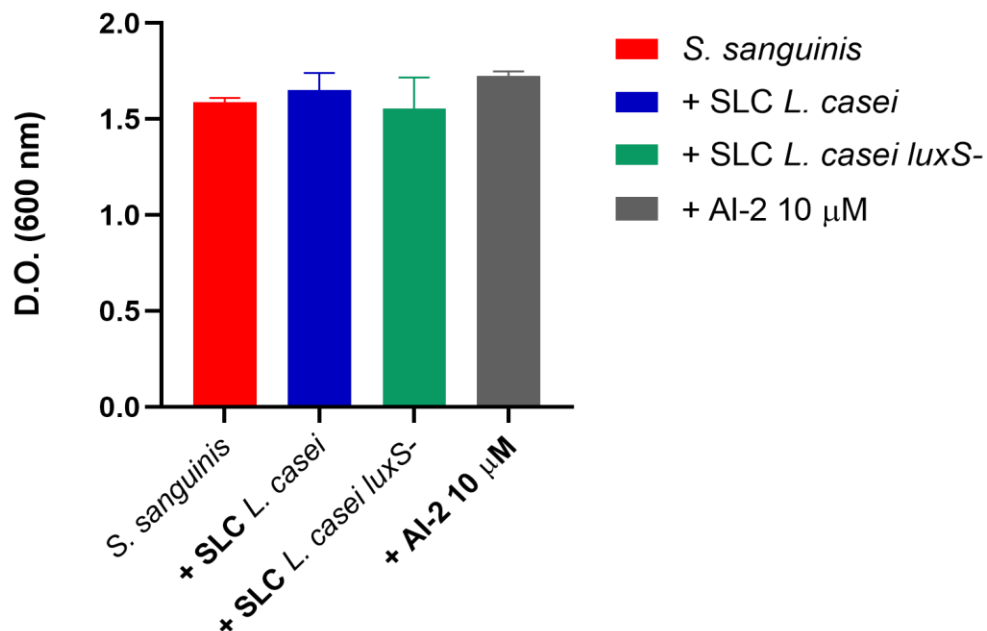


Figura 3. Efecto de *L. casei* y AI-2 sobre el crecimiento de *S. sanguinis*. No existen diferencias estadísticamente significativas (Kruskall Wallis, $p > 0,05$) entre los grupos. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas biológicas en triplicado ($n=9$).

6.3 Efecto de *L. casei* ATCC 4646 en la adhesión de *S. sanguinis* SK36

Para determinar el efecto de *L. casei* ATCC 4646 en la adhesión de *S. sanguinis*, se analizó ésta en presencia y ausencia del SLC de *L. casei* ATCC 4646 silvestre y *L. casei luxS*⁻. Además, se estudió el efecto del AI-2 sintetizado químicamente. Los resultados se presentan en la Figura 4, donde se observa adherencia de células viables metabólicamente activas de *S. sanguinis* en todas las condiciones ensayadas. No se produjo aumento o disminución estadísticamente significativa al comparar la adhesión del control positivo de *S. sanguinis* SK36 con los grupos de estudio que poseen el SLC de *L. casei* (silvestre y mutante *luxS*⁻) y AI-2 sintetizado químicamente.

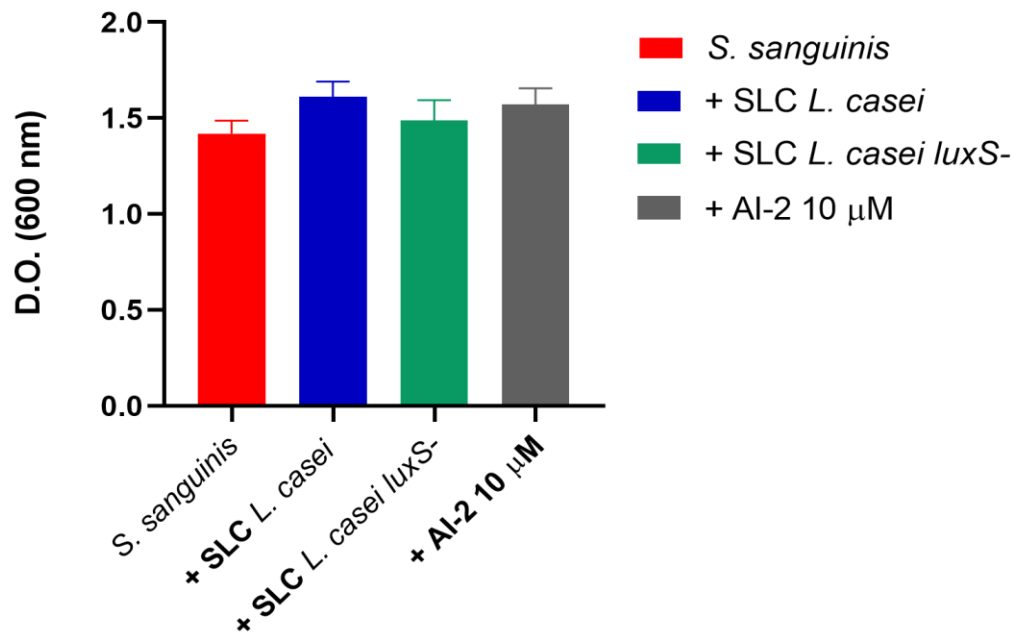


Figura 4. Efecto de *L. casei* y AI-2 sobre la adherencia de *S. sanguinis*. No hay diferencias estadísticamente significativas (Kruskall Wallis, $p > 0,05$). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas biológicas en triplicado ($n=9$).

6.4 Efecto de *L. casei* ATCC 4646 en la formación de biopelícula de *S. sanguinis* SK36

Con la finalidad de determinar el efecto de *L. casei* en la formación inicial de biopelícula *in vitro* de *S. sanguinis*, se analizó ésta en presencia de SLC de *L. casei* (silvestre y mutante *luxS*⁻). Además, se estudió el efecto de AI-2 sintetizado químicamente.

Los resultados se presentan en la Figura 5, donde al realizar el análisis de datos no existe diferencia estadísticamente significativa al comparar la formación de biopelículas del control positivo de *S. sanguinis* SK36 con los grupos de estudio que poseen el SLC de *L. casei* (silvestre y mutante *luxS*⁻) y AI-2 sintetizado químicamente.

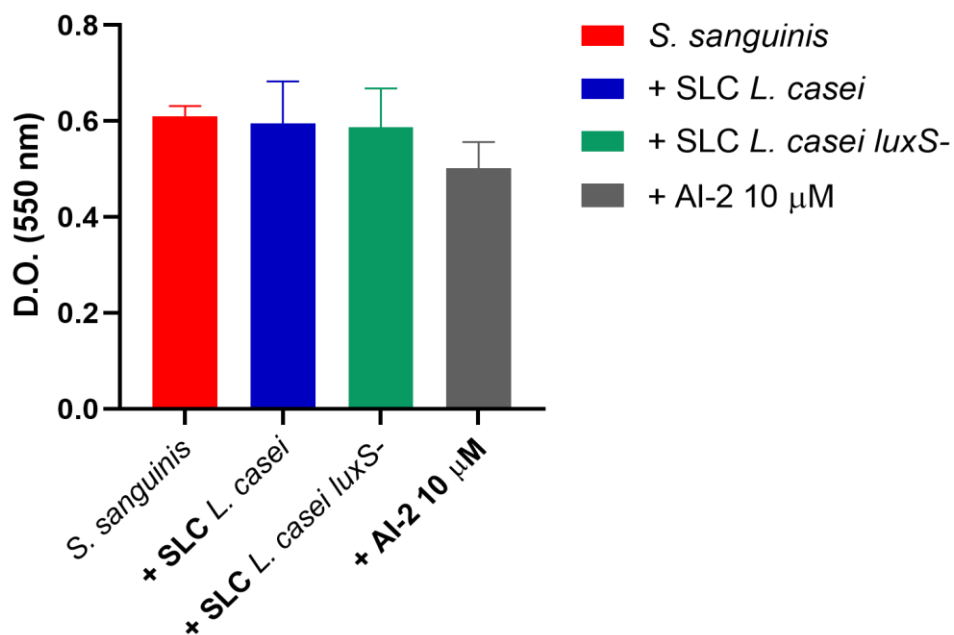


Figura 5. Efecto de *L. casei* y AI-2 en la formación de biopelículas de *S. sanguinis*. No presenta diferencias estadísticamente significativas para todos los grupos (Kruskall Wallis, $p > 0,05$). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas biológica en triplicado ($n=9$).

7. DISCUSIÓN

Hasta la fecha, no existen reportes sobre el efecto que posee *L. casei* al interactuar con *S. sanguinis* a través de *quorum sensing* mediado por la molécula de señalización AI-2. En este estudio se propuso que *L. casei* ATCC 4646, a través de autoinductor-2, generaría un efecto negativo en el crecimiento, la adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36. Con los resultados obtenidos es posible determinar que los SLC de *L. casei* ATCC 4646, *L. casei luxS* y A-2 exógeno no fueron capaces de generar una alteración en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36, por lo que se rechaza la hipótesis planteada.

7.1 Producción de AI-2 de *L. casei* ATCC 4646 y *S. sanguinis* SK36

Para determinar si *L. casei* ATCC 4646 y *S. sanguinis* SK36 son capaces de producir AI-2 y los niveles de esta molécula, se obtuvieron los sobrenadantes libres de células a partir de sus cultivos en medio BHI. Estos fueron incubados con la cepa reportera *V. harveyi* ATCC BAA-1117, la cual produce bioluminiscencia como respuesta a la detección de AI-2 funcional en el medio externo (Taga y Xavier, 2011). Con respecto a *L. casei*, se obtuvo que, en las condiciones analizadas, produjo al menos 3 veces más AI-2 que *S. sanguinis*, alcanzando una concentración de 5,13 μM . Otros estudios indican que *L. casei* es capaz de producir hasta 40 μM de AI-2 en medio MRS (Villarreal, 2017). En este estudio el microorganismo se creció en medio BHI para no generar efectos producto del medio de cultivo al colocar el SLC en *S. sanguinis*. Este crecimiento en un medio diferente podría haber generado un estrés en la bacteria, desencadenando la menor producción de AI-2 por parte de *L. casei*. Esto ha sido descrito en microorganismos como *L. rhamnosus* y *L. plantarum* durante el paso del tracto gastrointestinal, donde se vio modificación en la actividad de producción de AI-2 frente al shock de exponerlas a pH ácido (Yeo y cols., 2015). Esto se ve respaldado en el estudio de Moslehi-Jenabian y cols. (2009) quien descubrió que la producción de AI-2 está

directamente relacionada con el estrés ácido en otras especies de *Lacticaseibacillus*, al disminuir el pH del medio. Esto no ha sido estudiado en *L. casei*, pero sería relevante estudiar la influencia del pH en los mecanismos de comunicación en esta bacteria.

En el caso de *L. casei luxS*⁻, en este estudio se observó producción de AI-2. Este microorganismo al enfrentarse a condiciones diferentes podría haber producido autoinductor a través de una vía alternativa, como se ha descrito en *Escherichia coli*, cuya mutante *luxS*⁻ es capaz de sintetizar AI-2 a través de una ruta alternativa involucrando el metabolismo de azúcares pentosas en vez del ciclo del metilo activado (Tavender y cols., 2008; Li y cols., 2006).

En los resultados obtenidos en este trabajo se obtuvo una producción de AI-2 de *S. sanguinis* SK36 de 1,84 μ M. Esto es similar a lo descrito por Redanz y cols. (2012), donde la producción de AI-2 por *S. sanguinis* es del orden de 3 μ M en fase estacionaria, y cambia con la fase de cultivo.

7.2 Efecto de *L. casei* y AI-2 sobre el crecimiento de *S. sanguinis* SK36

Como se observó en la Figura 3 no existen diferencias estadísticamente significativas respecto al crecimiento de *S. sanguinis* en ausencia o presencia del SLC de *L. casei* o AI-2 exógeno. A la fecha no se ha descrito otro estudio que muestre la interacción de *S. sanguinis* con otro microorganismo oral mediado por *quorum sensing*. Sin embargo, se ha estudiado en otros microorganismos como *L. rhamnosus*, que la supresión de *luxS* genera una disminución en el crecimiento de la misma bacteria. En este estudio se adicionó metionina y cisteína, para reponer la función del ciclo del metilo activado, no observándose una recuperación en el crecimiento. No obstante, se verificó que, complementando el gen en dicha cepa mutante, se corrige el defecto en el crecimiento (Lebeer y cols., 2007).

Si bien no existen estudios que hayan abordado el efecto de AI-2 sobre el crecimiento de *S. sanguinis*, Redanz y cols. (2012), determinaron que la mutante de delección de *luxS* en *S. sanguinis* SK36, la cual no produce AI-2, no presenta el crecimiento alterado en comparación a la cepa silvestre. Tampoco evidenciaron

cambios en el crecimiento al complementar genética o químicamente los niveles de AI-2 en el medio.

7.3 Efecto de *L. casei* ATCC 4646 en la adhesión de *S. sanguinis*

Como se observó en la Figura 4 no existen diferencias estadísticamente significativas respecto a la adhesión de *S. sanguinis* en presencia y ausencia de SLC de *L. casei* y AI-2 exógeno. A la fecha no hay reportes de estudios del efecto de A-2 en la adhesión de *S. sanguinis*. Sin embargo, en otros microorganismos Gram positivo orales, como en el estudio realizado por Buck y cols. (2009), se analizó el efecto de AI-2 en la adhesión de *L. acidophilus*, utilizando una cepa mutante del gen *luxS* que no producía AI-2. Se observó una disminución en la adhesión de células epiteliales intestinales *in vitro* en comparación al grupo control.

Autores definen AI-2 como una molécula señal de concentración dependiente y establecieron una concentración óptima de AI-2 para que existiera un sistema de comunicación entre *Streptococcus oralis* – *Actinomyces naeslundii* (Rickard y cols., 2006) y *Streptococcus gordonii* - *Streptococcus oralis* (Cuadra-Saenz y cols., 2012). Por lo tanto, sería interesante evaluar en *S. sanguinis* si la adhesión es dependiente de la concentración de AI-2.

7.4 Efecto de *L. casei* ATCC 4646 en la formación de biopelícula de *S. sanguinis*

La formación de biopelículas es un proceso que consta de ciertas etapas previas que fueron analizadas en este estudio, siendo la primera de estas la adhesión a la superficie dentaria, seguido por la acumulación bacteriana mediante adherencia intra e interespecies y posterior maduración de la biopelícula (Hojo y cols., 2009; He y cols., 2015). Es por esto, que previamente los ensayos ejecutados fueron crecimiento y adhesión bacteriana *in vitro* de *S. sanguinis*.

Para cuantificar la formación de biopelícula se utilizó el ensayo de cristal violeta. Este ensayo colorimétrico tiene como objetivo la cuantificación espectrofotométrica

de la adhesión y formación de biopelícula. Si bien, *S. sanguinis* fue capaz de formar biopelícula en la superficie de los pocillos, se determinó que no existió diferencia estadísticamente significativa ante la exposición a los SLC estudiados. Este resultado se condice con lo reportado por Redanz y cols. (2012), donde se observó que la formación de biopelículas de la mutante de *S. sanguinis* SK36 *luxS* no se modifica en presencia de diferentes concentraciones de DPD, entre 0 y 25 μM .

Este estudio 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. Para la complementación del estudio del sistema de comunicación *quorum sensing*, es necesario realizar más estudios sobre el efecto que tiene las condiciones del medio en las concentraciones producidas de AI-2.

Los resultados permiten señalar que *S. sanguinis* SK36 no se ve influenciada por elevadas concentraciones de AI-2 en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas, al menos en las condiciones ensayadas en este estudio. De manera diferente a lo descrito para otros microorganismos Gram positivo, esta cepa habría desarrollado la capacidad de adherirse y de formar biopelículas por sí sola en superficies sólidas, aún en ausencia de AI-2. Esto podría conferirle ventajas evolutivas para la colonización y para su permanencia sobre superficies de la cavidad oral.

8. CONCLUSIONES

En esta investigación se analizó el efecto de *L. casei* ATCC 4646 en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas de *S. sanguinis* SK36 a través del mecanismo de comunicación *quorum sensing* mediado por AI-2. Entonces, se concluye que:

- 1.- *S. sanguinis* SK36 es capaz de adherirse y formar biopelículas monoespecie sin requerir un estímulo externo.
- 2.- El crecimiento, adhesión y formación de biopelículas *in vitro* de *S. sanguinis* SK36 no se ven influenciados en presencia de SLC de *L. casei* ATCC 4646.
- 3.- El autoinductor-2 10 μ M sintetizado químicamente no presenta efectos sobre el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas *in vitro* de *S. sanguinis* SK36.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnello, M., Marques, J., Cen, L., Mittermuller, B., Huang, A., Chaichanasakul Tran, N., Shi, W., He, X., & Schroth, R. J. (2017). Microbiome Associated with Severe Caries in Canadian First Nations Children. *Journal of dental research*, 96(12), 1378–1385.
- Badet, C., & Thebaud, N. B. (2008). Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *The open microbiology journal*, 2, 38–48.
- Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., & Klaenhammer, T. R. (2009). Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of applied microbiology*, 107(1), 269–279.
- Callaway, A., Kostrzewa, M., Willershausen, B., Schmidt, F., Thiede, B., Küpper, H., & Kneist, S. (2013). Identification of Lactobacilli from deep carious lesions by means of species-specific PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical laboratory*, 59(11-12), 1373–1379.
- Cannon, J. P., Lee, T. A., Bolanos, J. T., & Danziger, L. H. (2005). Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 24(1), 31–40.
- Carrillo C. (2010). Desmineralización y remineralización. *ADM*, 67, 30- 33.
- Cuadra-Saenz, G., Rao, D. L., Underwood, A. J., Belapure, S. A., Campagna, S. R., Sun, Z., & Rickard, A. H. (2012). Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing streptococci in oral biofilms. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(7), 1783–1795.
- Damé-Teixeira, N., Ev, L. D., Bitello-Firmino, L., Soares, V. K., Dalalba, R. S., Rup, A. G., Maltz, M., & Parolo, C. (2021). Characterization of Lactobacilli isolated from carious dentin after selective caries removal and cavity sealing. *Archives of oral biology*, 121, 104988.

Do, A. D., Chang, C. C., Su, C. H., & Hsu, Y. M. (2021). Lactobacillus rhamnosus JB3 inhibits Helicobacter pylori infection through multiple molecular actions. *Helicobacter*, 26(3), e12806.

Figuroa-Gordon, M., Alonso, G. & Acevedo A. (2009). Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la lesión de caries dental. *Acta Odontológica Venezolana* 47:1.

Ge, Y., Caufield, P. W., Fisch, G. S., & Li, Y. (2008). Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis colonization correlated with caries experience in children. *Caries research*, 42(6), 444–448.

Giacaman, R. A., Torres, S., Gómez, Y., Muñoz-Sandoval, C., & Kreth, J. (2015). Correlation of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis colonization and ex vivo hydrogen peroxide production in carious lesion-free and high caries adults. *Archives of oral biology*, 60(1), 154–159.

Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta histochemica*, 120(4), 303–311.

Grigalauskiene, R., Slabšinskiene, E., & Vasiliauskiene, I. (2015). Biological approach of dental caries management. *Stomatologija*, 17(4), 107–112

Guo, L., He, X., & Shi, W. (2014). Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Frontiers in microbiology*, 5, 328.

Hannig, C., Hannig, M., & Attin, T. (2005). Enzymes in the acquired enamel pellicle. *European journal of oral sciences*, 113(1), 2–13.

He, Z., Liang, J., Tang, Z., Ma, R., Peng, H., & Huang, Z. (2015). Role of the luxS gene in initial biofilm formation by Streptococcus mutans. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 25(1), 60–68.

Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T. y Maeda N. (2009). Bacterial Interactions in dental biofilm development. *Journal of dental research*, 88:982-990.

- Kareb, O., & Aider, M. (2020). Circuitos de detección de quórum en los mecanismos de comunicación de las bacterias y su implicación en la biosíntesis de bacteriocinas por bacterias del ácido láctico: una revisión. *Probióticos y proteínas antimicrobianas*, 12(1), 5–17.
- Kianoush, N., Adler, C. J., Nguyen, K. A., Browne, G. V., Simonian, M., & Hunter, N. (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PloS one*, 9(3), e92940.
- Klinke, T., Kneist, S., de Soet, J. J., Kuhlisch, E., Mauersberger, S., Forster, A., & Klimm, W. (2009). Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries research*, 43(2), 83–91.
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr, Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature reviews. Microbiology*, 8(7), 471–480.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C., Verhoeven, T. L., Fadda, A. A., Marchal, K., & 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. *Journal of bacteriology*, 189(3), 860–871.
- Lemos, J. A., Abranches, J., Koo, H., Marquis, R. E., & Burne, R. A. (2010). Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 666, 87–102.
- Li, J., Wang, L., Hashimoto, Y., Tsao, C. Y., Wood, T. K., Valdes, J. J., Zafiriou, E., & Bentley, W. E. (2006). A stochastic model of *Escherichia coli* AI-2 quorum signal circuit reveals alternative synthesis pathways. *Molecular systems biology*, 2, 67.
- Liu, L., Wu, R., Zhang, J., & Li, P. (2018). Overexpression of luxS Promotes Stress Resistance and Biofilm Formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 by Regulating the Expression of Multiple Genes. *Frontiers in Microbiology*, 2628.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (2015). Brock. Microbiología de los microorganismos. Editorial Pearson 13ava Edición.

Marchant, S., Brailsford, S. R., Twomey, A. C., Roberts, G. J., & Beighton, D. (2001). The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries research*, 35(6), 397–406.

Marsh P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC oral health*, 6 Suppl 1(Suppl 1), S14.

Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K., & Stoneking, M. (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome research*, 19(4), 636–643.

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

Nobbs, A. H., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2009). Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(3), 407–450.

Pereira, C. S., Thompson, J. A., & Xavier, K. B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 37(2), 156–181.

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

Redanz, S., Standar, K., Podbielski, A., & Kreikemeyer, B. (2012). Heterologous expression of sahH reveals that biofilm formation is autoinducer-2-independent in *Streptococcus sanguinis* but is associated with an intact activated methionine cycle. *The Journal of biological chemistry*, 287(43), 36111–36122.

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

- Rickard, A. H., Palmer, R. J., Jr, Blehert, D. S., Campagna, S. R., Semmelhack, M. F., Eglund, P. G., Bassler, B. L., & Kolenbrander, P. E. (2006). Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Molecular Microbiology*, 60(6), 1446–1456.
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *Lancet (London, England)*, 369(9555), 51–59.
- Taga, M. E., & Xavier, K. B. (2011). Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. *Current protocols in microbiology, Chapter 1, Unit1C.1*.
- Trappetti, C., Potter, A. J., Paton, A. W., Oggioni, M. R., & Paton, J. C. (2011). LuxS mediates iron-dependent biofilm formation, competence, and fratricide in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 79(11), 4550–4558.
- Tavender, T. J., Halliday, N. M., Hardie, K. R., & Winzer, K. (2008). LuxS-independent formation of AI-2 from ribulose-5-phosphate. *BMC microbiology*, 8, 98.
- Villarroel R. (2017). Participación de quorum sensing, mediante autoinductor-2, en la adhesión y desarrollo de biopelículas de *Lactobacillus casei* ATCC 4646. Tesis para optar al título de cirujano dentista. Universidad de Chile, Santiago.
- Wilson, C. M., Aggio, R. B. M., O'Toole, P. W., Villas-Boas, S., & Tannock, G. W. (2012). Transcriptional and metabolomic consequences of luxS inactivation reveal a metabolic rather than quorum-sensing role for LuxS in *Lactobacillus reuteri* 100-23. *Journal of Bacteriology*, 194(7), 1743–1746.
- Wright, C. J., Burns, L. H., Jack, A. A., Back, C. R., Dutton, L. C., Nobbs, A. H., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Molecular oral microbiology*, 28(2), 83–101.
- Yeo, S., Park, H., Ji, Y., Park, S., Yang, J. y cols., (2015). Influence of gastrointestinal stress on autoinducer-2 activity of two *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(7): fiv065.

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

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

10. ANEXOS Y APÉNDICES



CARTA – CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRI-ODO

Santiago, 24 de agosto de 2021

Mat.: Asigna Código DIFO: 2021/14

Dr. Claudia Lefimil Puente

Investigadora Responsable PRI-ODO 2021/14
Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología

PRESENTE

Estimada Dra. Lefimil:

Informo a usted que con fecha 24 de agosto de 2021, el Proyecto PRI-ODO, titulado: "Comunicación Mediante Quorum Sensing en Microorganismos Orales", del cual usted es la Investigadora Responsable, ha quedado inscrito en la DIFO con el **Código DIFO PRI-ODO 2021/14**, autorizándose su ejecución.

Este Proyecto cuenta con:

1. Carta Director de Departamento – IR.	SI	NO	N/A
2. Certificado de Aprobación del Comité de Ética de la FOUCh	SI	NO	N/A
3. Certificado de Aprobación del Comité de Bioseguridad	SI	NO	N/A

A partir de la Fecha de Registro del Proyecto, usted debe considerar el período de duración de 2 años, por lo tanto:

Fecha de Entrega Informe Final:	24 de agosto de 2023.
---------------------------------	-----------------------

Deseándole el mayor de los éxitos, se despide cordialmente,



DR. ALFREDO MOLINA BERRÍOS

Director de Investigación

Facultad de Odontología - Universidad de Chile

AMB/rcm.