



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

**EFFECTO DE AUTOINDUCTOR-2 DE *Lactocaseibacillus casei* SOBRE  
FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *Candida albicans***

**Carolina Paz Belmar Lillo**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Alfredo Molina-Berríos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente**

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2021/14  
Santiago - Chile  
2022**





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

**EFFECTO DE AUTOINDUCTOR-2 DE *Lactocaseibacillus casei* SOBRE  
FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *Candida albicans***

**Carolina Paz Belmar Lillo**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Alfredo Molina-Berríos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente**

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2021/14  
Santiago - Chile  
2022**

*A mi "Mama Sarita", que espero esté orgullosa y feliz, desde donde esté.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres Verónica y Rodolfo, que siempre se han preocupado de poner todo su esfuerzo para entregarnos lo mejor junto a mi hermano. Gracias por su paciencia, por los infinitos consejos para enfrentar la vida y por permitirme cumplir mis sueños. También a mi hermano Pablo, por cada día lograr sacarme una sonrisa. Los amo con todo mi corazón y siempre estaremos juntos.

A mis amigas de la vida Scarlett, Caro Z. y Clau, con quienes he podido compartir desde el colegio y pese al paso del tiempo, siempre han estado ahí para apoyarme.

A los amigos que conocí en esta facultad Florencia, Débora, Denny y Diego, simplemente sin ustedes no hubiese sido igual la forma en que reí, lloré y disfruté este camino universitario. A Carlitos por ser el mejor compañero de clínica en años difíciles. A mi amigo Matías por siempre estar para darme un consejo desde la distancia.

A Diego, por toda la contención y cariño que me ha entregado este tiempo para verme feliz y ayudarme a crecer como persona. Gracias por estar en las buenas y las malas.

A los tutores de esta tesis, Alfredo Molina y Claudia Lefimil, por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto. Profes, les agradezco su paciencia, la mejor disposición que siempre tuvieron para entregar sus conocimientos y por guiarme en este largo proceso que pese a todo y sin duda, disfruté de principio a fin.

Al laboratorio de Farmacología y también al de Bioquímica y Biología Oral junto con todos sus integrantes, en especial a mi compañero Pablo con quien compartí gran parte de esta etapa.

A todos los funcionarios y buenos docentes de la FOUCH con los que tuve la oportunidad de compartir y sentir que hicieron un aporte positivo e imborrable en mi vida.

Gracias totales.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1 Microbiota en la cavidad oral.....	2
1.2 <i>Candida albicans</i> .....	2
1.3 Factores de virulencia de <i>Candida albicans</i> .....	3
1.4 <i>Candida albicans</i> y cavidad oral.....	5
1.5 Terapias farmacológicas .....	5
1.6 <i>Lactocaseibacillus</i> spp.....	7
1.7 Biopelícula dental e interacciones microbianas .....	8
1.8 Interacción entre <i>Lactocaseibacillus</i> y <i>Candida albicans</i> .....	10
2. HIPÓTESIS.....	12
3. OBJETIVO GENERAL.....	12
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
5.1 Tipo de estudio realizado .....	13
5.2 Cultivos microbiológicos.....	13
5.3 Procedimientos.....	14
5.3.1 Preparación de sobrenadante de <i>L. casei</i> ATCC 4646 .....	14
5.3.2 Detección de AI-2 en SLC de cepas de <i>L. casei</i> .....	14
5.3.3 Análisis del efecto de AI-2 en el crecimiento de <i>Candida albicans</i> .16	
5.3.4 Análisis del efecto de AI-2 en la adhesión y formación de biopelículas de <i>Candida albicans</i> .....	16
5.3.5 Análisis del efecto de AI-2 en la morfogénesis de <i>Candida albicans</i> .....	17
5.3.6 Análisis estadísticos .....	17
6. RESULTADOS .....	18
6.1 Presencia y funcionalidad de AI-2 proveniente de <i>L. casei</i> ATCC 4646.. .....	18
6.2 Efecto del AI-2 en el crecimiento de <i>C. albicans</i> ATCC 90029 y ATCC 10231 .....	19
6.2.1 Efecto del AI-2 sobre la velocidad de crecimiento en <i>C. albicans</i> ATCC	

90029 y ATCC 10231.....	23
6.3 Efecto del AI-2 en la adhesión de <i>C. albicans</i> ATCC 90029 y ATCC 10231 .....	24
6.4 Efecto del AI-2 en la formación de biopelículas de <i>C. albicans</i> ATCC 90029 y ATCC 10231.....	26
6.5 Efecto del AI-2 en la morfogénesis de <i>C. albicans</i> ATCC 90029 y ATCC 10231 .....	28
7. DISCUSIÓN.....	31
8. CONCLUSIÓN.....	37
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
10. ANEXOS Y APÉNDICES .....	45
10.1 Anexo 1.....	45

## RESUMEN

### Introducción.

Una de las infecciones fúngicas más frecuentes es la candidiasis oral. Es causada principalmente por *Candida albicans*, hongo polimórfico que presenta factores de virulencia, como la formación de biopelículas, aumentando su resistencia frente a antifúngicos. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. Se ha propuesto el uso de bacterias probióticas como *Lactocaseibacillus casei* como una alternativa, que podrían interactuar con *Candida* mediante *quorum sensing*, proceso de comunicación celular que involucra moléculas llamadas autoinductores como el AI-2, una señal común entre bacterias. Sin embargo, no está reportado que *Lactocaseibacillus casei* utilice AI-2 con *Candida albicans*.

El objetivo del estudio fue determinar la participación de AI-2 producido por *Lactocaseibacillus casei* ATCC 4646 en el crecimiento, morfogénesis, adhesión y formación de biopelículas de *Candida albicans*.

**Material y métodos.** Se utilizaron las cepas *L. casei* ATCC 4646 y *C. albicans* ATCC 90029 y 10231. Se detectó presencia y funcionalidad de AI-2 producido por *L. casei* ATCC 4646 mediante la cepa reportera *V. harveyi* BB170. Se analizó el efecto del AI-2 contenido en el sobrenadante libre de células (SLC) de *L. casei* sobre *C. albicans* a través de: a) curvas de crecimiento, b) adhesión y formación de biopelículas (ensayo de cristal violeta) y c) morfogénesis (microscopía óptica). Como controles se utilizó AI-2 exógeno y fluconazol.

**Resultados.** Se detectaron cantidades significativas de AI-2 en el SLC de *L. casei*. El SLC disminuyó la velocidad de crecimiento y adhesión en *C. albicans* ATCC 90029, mientras que para la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 inhibió la adhesión y formación de biopelículas.

**Conclusiones.** AI-2 participaría en algunos procesos de los factores de virulencia de *C. albicans*.



## 1. MARCO TEÓRICO

### **Microbiota en la cavidad oral**

La cavidad oral es un ecosistema compuesto por diferentes nichos ecológicos, los cuales pueden ser tejidos duros y blandos como dientes, surco gingival, lengua, mejillas, paladar duro y blando, principalmente. Cada uno de ellos presenta condiciones ambientales únicas, lo que propicia el establecimiento de comunidades de microorganismos, cuantificados en más de 700 especies entre virus, protozoos, arqueas, bacterias y hongos (Dewhirst y cols., 2010).

A diferencia de la microbiota comensal encontrada en otros nichos del ser humano, que generalmente vive en equilibrio con el hospedero, parte de la microbiota oral normal que involucra a bacterias como *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, son responsables, junto a otros factores, de dos de las patologías más prevalentes de la cavidad oral: caries dental y enfermedad periodontal (Wade, 2013; Sedghi y cols., 2021).

Por otro lado, especies fúngicas como *Candida albicans* son responsables de la candidiasis oral, una infección en la mucosa oral que ha aumentado su incidencia en las últimas décadas y pese a que las terapias antifúngicas existentes son efectivas, estas presentan efectos adversos y resistencia antifúngica en aumento (Mundula y cols., 2019).

### **Candida albicans**

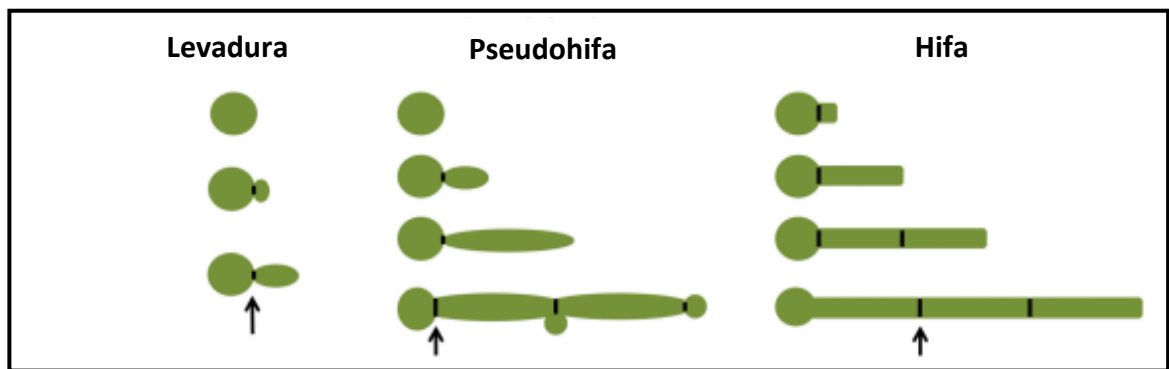
Dentro de las especies aisladas de *Candida*, la que se encuentra con mayor frecuencia en el ser humano es *Candida albicans* (Su y cols., 2018).

*Candida albicans* es un hongo polimórfico que se encuentra como comensal principalmente en la cavidad oral, mucosa vaginal y tracto gastrointestinal. Sin embargo, frente a un estado inmunosuprimido del hospedero, alteración de las

barreras tisulares y desbalance de la microbiota comensal, puede originar infecciones fúngicas a nivel local e incluso sistémico (Albuquerque y Casadevall, 2012; D' Enfert y cols., 2020). De esta manera, es responsable del 70% de las infecciones fúngicas alrededor del mundo (Talapko y cols., 2021) y causa la muerte de más de 1 millón de personas anualmente, especialmente de aquellas que se encuentran en condiciones hospitalarias (Su y cols., 2018). Esto se debe a que es capaz de adaptarse al ambiente del hospedero rápidamente, incluso cuando la biodisponibilidad de los nutrientes está restringida (Dadar y cols., 2018).

### **Factores de virulencia de *Candida albicans***

Una de las características más relevantes de *Candida albicans* es el polimorfismo, que es la capacidad que posee para cambiar de forma, las cuales corresponden a levadura, hifa y su forma transicional llamada pseudohifa (Figura 1). Este fenómeno implica la transformación reversible de una forma comensal a una patológica, que depende de los cambios generados en el ambiente donde está localizado (Talapko y cols., 2021).



**Figura 1.** Cambios morfológicos de *Candida albicans* correspondientes a levadura, pseudohifa e hifa (modificado de Chen y cols., 2020).

Las levaduras son variaciones morfológicas de *Candida albicans*, las cuales estructuralmente se presentan de forma redondeada u ovaladas en la mayoría de las condiciones de cultivo *in vitro*. Se asocian principalmente a un estado simbiótico en la cavidad oral, mucosa vaginal y la piel. Sin embargo, también pueden asociarse a la formación de biopelículas (Chen y cols., 2020). Por otro lado, las pseudohifas

presentan una morfología elíptica y multicelular, con constricciones en el septum. Mientras que las hifas son cadenas de células tubulares, sin estrechamiento en los septums (Talapko y cols., 2021).

Ambas formas celulares, pseudohifa e hifa, están involucradas en proceso de filamentación, el cual es clave para la formación de biopelículas de *Candida albicans*. Este factor de virulencia se logra frente a condiciones ambientales como temperatura mayor a 37°, pH alcalino, suero, altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, falta de carbono y nitrógeno en presencia de N-acetilglucosamina (Talapko y cols., 2021). Por otro lado, es importante resaltar, que una mayor capacidad de filamentación se asocia a un mayor grado de adhesión a las superficies mucosas y/o penetración en los tejidos colonizados, siendo un factor de virulencia crucial (Matsubara y cols., 2016).

El desarrollo de las biopelículas de *Candida albicans* ocurre progresivamente, y es clasificado en 4 etapas. En primer lugar, se produce la adhesión y adsorción de las levaduras a un sustrato, donde se forma la capa basal de la biopelícula. Luego, se procede a la formación de microcolonias, producción de matriz extracelular y filamentación, en donde las células forman protrusiones elongadas y continúan su crecimiento en forma de hifas. Posteriormente, en la fase de maduración, se produce la acumulación de la matriz extracelular compuesta por polisacáridos. Finalmente, se genera la dispersión de las células de la biopelícula madura no adheridas generalmente levaduriformes, confiriéndoles la capacidad de poder formar nuevas biopelículas (Takapko y cols., 2021; Ponde y cols., 2021).

Una vez establecida la biopelícula, son altamente tolerantes a las terapias antifúngicas y pueden servir como reservorio para infecciones recurrentes ya que, además, las biopelículas otorgan diversos mecanismos de escape al sistema inmune (Ponde y cols., 2021; Atriwal y cols., 2021).

De esta forma, la formación de biopelículas, plasticidad metabólica, evasión inmune, expresión de adhesinas en la superficie, secreción de enzimas hidrolíticas y tigmotropismo se constituyen como algunos de los factores que promueven su

virulencia y el poder generar infecciones fúngicas severas (Song y Lee, 2017; Patel, 2022).

### **Candida albicans y cavidad oral**

Particularmente, en la cavidad oral, *C. albicans* es capaz de generar candidiasis sobre la mucosa oral por el sobrecrecimiento del hongo y la invasión a los tejidos. La candidiasis oral se considera la infección por hongos más frecuente en el ser humano y a pesar de que pueden participar diversas especies del género *Candida*, *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada (Lewis y Williams, 2017; Talapko y cols., 2021).

La candidiasis oral es dividida en 3 grupos:

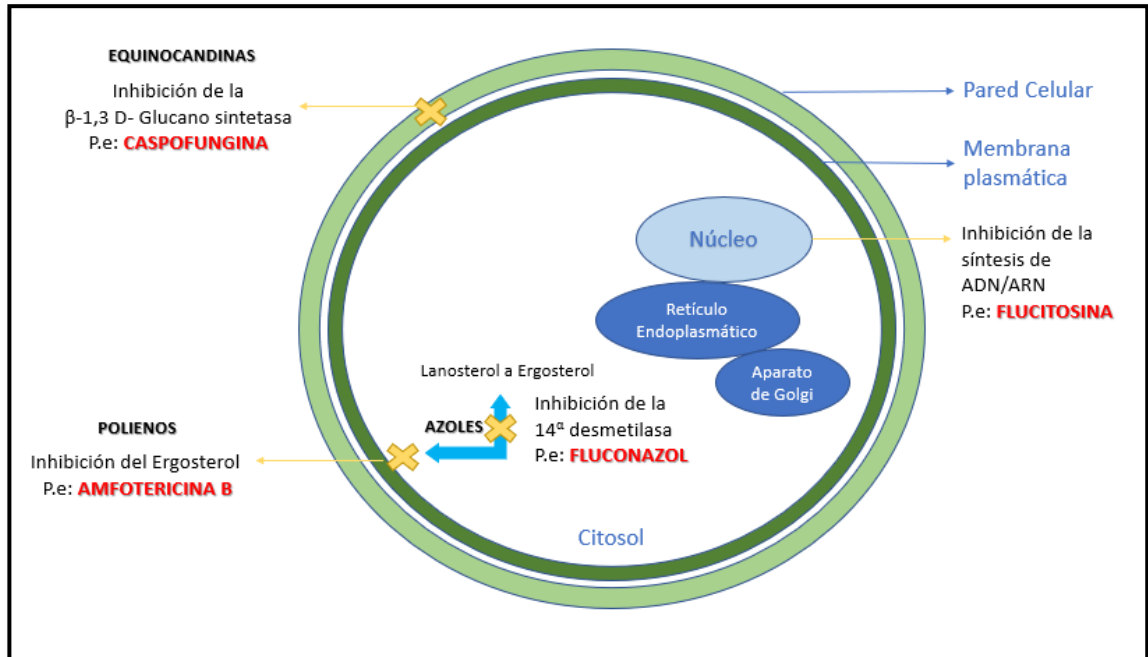
- a) manifestaciones agudas (candidiasis aguda pseudomembranosa y eritematosa)
- b) manifestaciones crónicas (estomatitis subprotésica, queilitis angular, queilocandidiasis, candidiasis hiperplásica crónica y glositis romboidal media)
- c) síndromes crónicos mucocutáneos

Todas ellas pueden presentar un amplio rango de síntomas, como sensación de ardor, lesiones y sangrado, lo que conlleva a una dificultad en la masticación y por consiguiente en la calidad de vida (Mundula y cols., 2019). Además, consideran ciertos factores predisponentes, tanto locales como sistémicos, como deficiencias nutricionales, disbiosis local, hipofunción salival, hábito tabáquico, uso de prótesis removible, inmunidad disfuncional de células T debido a alteraciones genéticas u otras infecciones (Vila y cols., 2020).

### **Terapias farmacológicas**

El tratamiento de infecciones leves a moderadas por *Candida* consiste en el uso de fármacos antifúngicos clasificados en grupos, como son los polienos (amfotericina B, nistatina), azoles (fluconazol, itraconazol, miconazol), equinocandinas (caspofungina), alilaminas (terbinafina) y flucitosina. El blanco farmacológico está dirigido a la vía de biosíntesis del ergosterol, pared celular fúngica o ADN/ARN

fúngico (Su y cols., 2018). Dentro de ellos, los más utilizados son los azoles, los cuales inhiben la biosíntesis del ergosterol y, en general, son fungistáticos (Figura 2) (Roemer y Krysan, 2022).



**Figura 2.** Mecanismos de acción de los fármacos antifúngicos más utilizados (modificado de Atriwal y cols., 2021).

La terapia estándar para el tratamiento de la candidiasis oral se basa en la administración tópica de antifúngicos por 7 a 14 días. Dentro de los más utilizados se encuentra clotrimazol, miconazol o nistatina; mientras que, para infecciones severas o en aquellos casos en que existan factores de riesgo para el desarrollo de infecciones sistémica (SIDA, inmunosupresión, etc.), el fármaco más utilizado es fluconazol, el cual es administrado por vía oral o por vía endovenosa (Talapko y cols., 2021). Sin embargo, miconazol interacciona con otros fármacos y puede inducir alteraciones a nivel hepático; mientras que la nistatina, además de presentar un sabor poco agradable, puede provocar alteraciones gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea (Ishikawa y cols., 2014).

Además, debido al aumento de la resistencia frente a antifúngicos, se ha planteado buscar alternativas terapéuticas que puedan inhibir o modular procesos asociados

a la patogenicidad de *Candida* spp. para así aumentar su susceptibilidad frente a antifúngicos convencionales (Spampinato y Leonardi, 2013; Su y cols., 2018). Dado lo anterior, se ha propuesto el uso de bacterias probióticas como una alternativa para el tratamiento de infecciones en el ser humano producidas por *Candida* spp., tanto para uso profiláctico como de manera terapéutica (Matsubara y cols., 2016).

### **Lacticaseibacillus spp.**

Entre las especies de bacterias ácido-lácticas más comunes se encontraban los miembros del género *Lactobacillus* spp., el cual, debido a los avances en secuenciación de genomas, ha sido re-estructurado taxonómicamente, dando origen a 25 géneros diferentes, entre los que se encuentran *Lacticaseibacillus* (*L. casei*, *L. rhamnosus*), *Limosilactobacillus* (*L. reuteri*) y *Lactiplantibacillus* (*L. plantarum*) (Zheng y cols., 2020).

*Lacticaseibacillus* spp. son bacterias Gram positivo, anaeróbicas estrictas o facultativas, acidogénicas y acidúricas en gran medida, ya que son capaces de crecer y sobrevivir en ambientes de bajo pH (Klinke y cols., 2009). Se caracterizan por tener un rol importante tanto en salud como en enfermedad, ya que han sido ampliamente usados como probióticos con el fin de estimular la inmunidad innata, manteniendo la salud del ser humano, además de poseer un efecto inhibitorio en la biopelícula cariogénica. Además, ha demostrado tener actividad antifúngica frente a especies como *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. (Song y Lee, 2017).

Por otra parte, *Lacticaseibacillus* spp. han sido relacionados con enfermedad de caries al ser encontrados principalmente en lesiones de caries dentinarias profundas, por lo que también son considerados como microorganismos cariogénicos (Klinke y cols., 2009). De esta forma, *Lacticaseibacillus* spp. juega un papel fundamental en el ecosistema oral. 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). Además, puede interactuar con levaduras

como *Candida* spp. al compartir los mismos nichos ecológicos en el hospedero que pueden resultar en relaciones antagónicas, sinérgicas o neutrales (Nogueira y cols., 2019).

Como un mecanismo para asegurar la supervivencia de bacterias y levaduras, la comunicación entre ellas juega un rol fundamental, y esta se refleja en la formación y coexistencia en biopelículas (Jakubovics y Kolenbrander, 2010).

### **Biopelícula dental e interacciones microbianas**

Como se mencionó anteriormente, las biopelículas o “*biofilms*” son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie y embebidos en una matriz extracelular, que pueden desarrollarse y crecer mediante la secreción de metabolitos utilizados como nutrientes. Esta forma de organización permite, por ejemplo, generar infecciones que a largo plazo dificultan su eliminación, ya que presentan gran resistencia a los agentes antimicrobianos y a la respuesta inmune del hospedero (Albuquerque y Casadevall, 2012).

Dentro de la cavidad oral, gran parte de los microorganismos se encuentran asociados de esta forma, en donde pueden adherirse a las superficies y permitir la agregación bacteriana mediante diferentes biopolímeros que componen la matriz extracelular. Además, al conformarse esta especie de andamio, mantiene próximos a los microorganismos permitiendo la interacción y comunicación entre ellos (Albuquerque y Casadevall, 2012).

Las interacciones microbianas, generadas en diferentes nichos del hospedero y de la cavidad oral, son mediadas por variados mecanismos y pueden llegar a ser complejas, ya que especies de este o diferente tipo coexisten de manera cooperativa, competitiva o neutral. De esta manera, se puede conducir a la inhibición de un microorganismo y al crecimiento dominante de otro mediante diferentes moléculas o factores que dependen de estímulos y cambios en el ambiente (Nogueira y cols., 2019).

Una forma de interacción se denomina *Quorum sensing* (QS), que corresponde a un mecanismo de comunicación químico entre especies microbianas, mediante

moléculas conocidas como autoinductores que son secretadas al medio externo celular, y al alcanzar un valor umbral de concentración permite a una célula detectarlos (Nadell y cols., 2008). De esta manera, el QS regula, a través de la expresión de genes, eventos relevantes para la supervivencia microbiana como, por ejemplo, competencia, bioluminiscencia, formación de biopelículas, secreción de factores de virulencia, esporulación y producción de antibióticos (Padder y cols., 2018).

Dependiendo del tipo de microorganismo, existen diferentes tipos de autoinductores para llevar a cabo este proceso. En bacterias Gram positivo se ha reportado la presencia de péptidos autoinductores específicos para cada especie; mientras que bacterias Gram negativo producen y censan N-acil homoserina lactonas (HSL). Por otro lado, existen moléculas como ácidos grasos, cetonas, epinefrina, norepinefrina, quinolonas y autoinductor-3, también involucradas en el proceso de señalización (Rémy y cols., 2018).

Además, dentro del QS existe un sistema de señalización que involucra a una molécula denominada Autoinductor-2 (AI-2), producida por la acción de la enzima LuxS. Esta cataliza la ruptura de S-Ribosil-Homocisteína (SRH) en homocisteína y dihidroxil-1-2,3-pentanediona o DPD, que al encontrarse en medio acuoso isomeriza a AI-2 (Sun y cols., 2004). Su importancia radica en que se encuentra presente tanto en bacterias Gram positivo como Gram negativo, por lo que ha sido sugerido como un mecanismo de comunicación universal entre bacterias.

AI-2 fue originalmente descrito en el organismo marino *Vibrio harveyi*, y actualmente es reconocido como una señal independiente de especies, que es producido y liberado entre las bacterias orales incluyendo *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y también *Streptococcus* como *S. gordonii* y *S. mutans* (Wright y cols., 2014).

Diversos estudios han relacionado a AI-2 con el desarrollo de biopelículas en la cavidad oral. Por ejemplo, *Actinomyces naeslundii* utiliza AI-2 de *Streptococcus oralis* para el crecimiento de biopelículas (Rickard y cols., 2006), al igual que *S. gordonii* con *P. gingivalis*, que requieren la presencia de AI-2 para la formación de biopelículas que incluya a ambos microorganismos (McNab y cols., 2002).



Además, los niveles de AI-2 constituyen un factor importante: se ha descrito que en bacterias comensales se requiere una determinada concentración para tener un efecto óptimo en la formación de biopelícula (Rickard y cols., 2006).

Sin embargo, la producción de AI-2 de *A. actinomycetemcomitans* inhibe la formación de biopelículas de *C. albicans* (Bachtiar y cols., 2014). Por lo tanto, la presencia de AI-2 en diversas bacterias sugiere que esta molécula de señalización puede representar un mecanismo desconocido protector de la microbiota normal bacteriana contra infecciones de *Candida albicans* (Bachtiar y cols., 2014).

Además, se ha reportado que moléculas ya mencionadas como tipo HSL, tienen efectos en la formación de biopelículas y morfogénesis de *Candida albicans* al inhibir la transición de la forma de levadura a hifa (Hall y cols., 2012).

Por otro lado, en levaduras del género *Candida*, existe otro tipo de moléculas de señalización que participan en QS, como alcoholes (farnesol, tirosol), lípidos (oxilipinas), péptidos (feromonas), acetaldehídos y algunos compuestos volátiles que regulan diversas funciones claves como la patogénesis, morfogénesis y filamentación (Padder y cols., 2018).

De esta manera, toma relevancia indagar de qué manera las especies bacterianas y fúngicas pueden llegar a interactuar mediante QS, e influir mutuamente en su desarrollo.

### **Interacción entre *Lactocaseibacillus* y *Candida albicans***

Estudios recientes han indagado respecto al vínculo que tienen *Lactocaseibacillus* y *C. albicans*. Sin embargo, la alta variabilidad de resultados ha impedido dilucidar el modo específico de la acción antifúngica que *Lactocaseibacillus* presenta sobre *C. albicans* (Allonsius y cols., 2019). Por ejemplo, se ha reportado que *L. rhamnosus* reduce la formación de hifas mediante una hidrolasa de peptidoglican (Msp1) que descompone la quitina, el principal componente polímero de la pared celular de *C. albicans* (Allonsius y cols., 2019).

Por otra parte, la interacción entre ambos microorganismos es particularmente relevante en el tracto reproductivo femenino, el cual está poblado por miembros del género *Lactocaseibacillus* bajo condiciones fisiológicas, donde impide la

colonización de *C. albicans* al reducir la adhesión del hongo a células epiteliales mediante la surlactina, un biosurfactante secretado que reduce los sitios de adhesión (Nogueira y cols., 2019). Además, se ha demostrado que, por ejemplo, especies de *Lacticaseibacillus* como *L. rhamnosus* y *L. casei* son capaces de tener acción antifúngica sobre *C. albicans* mediante la producción de ácido láctico, el cual es un metabolito bioactivo presente en el sobrenadante de cultivo y clave en *Lacticaseibacillus*, que difunde a través de la membrana fúngica y reduce el pH citoplasmático, causando la pérdida de la viabilidad de la levadura (Song y Lee, 2017). También se ha demostrado que péptidos antifúngicos producidos por *Lacticaseibacillus* pueden alterar la membrana fúngica o inactivar moléculas citoplasmáticas (Song y Lee, 2017). Sin embargo, este último mecanismo antifúngico no ha sido reportado hasta la fecha para *L. rhamnosus* y *L. casei*. Por lo tanto, se ha establecido que la comunicación entre bacterias y levaduras es a través de metabolitos, y que su identificación representaría un blanco para el diagnóstico y tratamiento de infecciones relacionadas.

A la fecha, existen algunos estudios sobre el efecto del AI-2 producido por bacterias sobre levaduras *Candida*, sin embargo, estos no han sido realizados con microorganismos de la cavidad oral.

*Lacticaseibacillus casei* corresponde a una especie encontrada con alta prevalencia en la cavidad oral, tanto en lesiones de caries como en saliva (Badet y Theubaud, 2008), Además, se han reportado efectos benéficos para la salud del ser humano al ser utilizado como probiótico, tanto a nivel oral presentando efectos positivos en el riesgo de caries (Sivamaruthi y cols., 2020) como a nivel gastrointestinal, principalmente (Hill y cols., 2018).

Debido a lo anterior, se convierte en un microorganismo llamativo para poder desarrollar este estudio.

De esta forma, en este estudio se propuso evaluar si existe interacción mediada por esta molécula, que permita una comunicación entre ambos microorganismos anteriormente descritos, proyectando a lo que podría suceder en cavidad oral. Por otra parte, se permitirá establecer el posible uso potencial de AI-2 bacteriano como un antifúngico contra especies de *Candida* resistentes.

## 2. HIPÓTESIS

El autoinductor-2 (AI-2) producido por *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646 inhibe el crecimiento, morfogénesis, adhesión y formación de biopelículas en las cepas ATCC 90029 y 10231 de *Candida albicans*.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de AI-2 producido por *Lacticaseibacillus casei* ATCC 4646 en el crecimiento, morfogénesis, adhesión y formación de biopelículas de *Candida albicans* ATCC 90029 y 10231.

## 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Establecer la presencia y funcionalidad de Autoinductor-2 producido por *L. casei* ATCC 4646.
- b) Estudiar el efecto del Autoinductor-2 de *L. casei* ATCC 4646 en el crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 y 10231.
- c) Estudiar el efecto del Autoinductor-2 de *L. casei* ATCC 4646 en la adhesión, morfogénesis y formación de biopelículas de *C. albicans* ATCC 90029 y 10231.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Tipo de estudio realizado

Este estudio se encuentra adscrito al Proyecto PRI-ODO 2021/14, cuya autorización de ejecución se encuentra en el Anexo 1. Corresponde a un estudio de tipo experimental (analítico y prospectivo).

### 5.2 Cultivos microbiológicos

En la tabla 1 se muestran los microorganismos utilizados y el lugar de procedencia de cada uno, junto a las condiciones estándar de crecimiento en el laboratorio. Todas estas cepas se encuentran disponibles en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral y en el Laboratorio de Farmacología. El crecimiento bacteriano de los cultivos fue monitoreado midiendo la Densidad Óptica a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) y para *C. albicans* a 450 nm (D.O.<sub>450</sub>).

**Tabla 1.** Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Fuente	Condiciones de almacenamiento	Condiciones de crecimiento
<i>Lactocaseibacillus casei</i> ATCC 4646	ATCC	MRS glicerol 30% a -80°C.	Medio MRS (Oxoid, UK), a 37°C en condiciones microaerofílicas por 48 h.
<i>Lactocaseibacillus casei</i> ATCC 4646 <i>luxS</i> <sup>-</sup>	ATCC	MRS glicerol 30% a -80°C.	Medio MRS (Oxoid, UK), a 37°C en condiciones microaerofílicas por 48 h.
<i>Vibrio harveyi</i> BB170	ATCC	Medio Luria Bertani-glicerol 30% a -80°C.	Medio AB (Medio ATCC: Medio 2746 de bioensayo de autoinductor), a 30°C en aerobiosis por 48 h.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	ATCC	Agar Sabouraud cloranfenicol	Medio agar Sabouraud Cloranfenicol a 30°C en

		(Biokar) a 4°C.	condiciones aeróbicas o microaerofílicas. Medio RPMI a 28°C.
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	ATCC	Agar Sabouraud cloranfenicol (Biokar) a 4°C.	Medio agar Sabouraud Cloranfenicol a 30°C en condiciones aeróbicas o microaerofílicas. Medio RPMI a 28°C.

### 5.3 Procedimientos

#### 5.3.1 Preparación de sobrenadante de *L. casei* ATCC 4646

El procedimiento para obtener el sobrenadante de los cultivos líquidos de *L. casei* se llevó a cabo como describió Buck y cols (2009). La cepa de *L. casei* fue cultivada en medio MRS modificado con galactosa al 2% (MRSm: 10 g/L peptona, 8 g/L Lab-Lemco, 4 g/L extracto de levadura, 20 g/L D-galactosa, 0,1% v/v sorbitan monooleato, 2 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g/L CH<sub>3</sub>COONa x 3H<sub>2</sub>O, 2 g/L citrato de triamonio, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,05 g/L MnSO<sub>4</sub> x 4H<sub>2</sub>O) y se incubó en condiciones microaerofílicas a 37°C. El medio MRS fue modificado, ya que como establece Sun y cols (2014), la glucosa inhibe la producción de luminiscencia por la cepa reportera *V. harveyi*. Luego, mediante centrifugación (Universal 320R HETTICH®, 7.690 g durante 6 minutos a 4°C) se obtuvieron los sobrenadantes libres de células y se neutralizó el pH de cada uno con NaOH estéril (medido con pHmetro), ya que *V. harveyi* no es viable en el medio ácido producido por *L. casei* (Sun y cols., 2014). Posterior a esto, los sobrenadantes se esterilizaron mediante filtros de membrana con tamaño de poro 0,22 µm (Syringe Filter, BIOFIL®) y fueron refrigerados a -80°C hasta su uso.

#### 5.3.2 Detección de AI-2 en SLC de cepas de *L. casei*

La presencia y actividad de AI-2 se detectó utilizando la cepa reportera *Vibrio harveyi* BB170, la cual produce luz en presencia de esta molécula (De

Keersmaecker y Vanderleyden, 2003; Taga y Xavier, 2011).

Se cultivó la cepa reportera durante 16 horas a 30°C en medio AB líquido. Posteriormente, se realizó un lavado de células mediante centrifugación (7000 g durante 10 minutos a 4°C) y resuspensión en medio AB fresco a una D.O.<sub>600</sub> de 0,5 y finalmente los cultivos fueron diluidos en una proporción de 1/500 en medio AB (Buck y cols., 2009).

Los sobrenadantes de *L. casei* ATCC 4646 y ATCC 4646 *luxS*<sup>-</sup> libres de células (SLC) y estériles (centrifugados, neutralizados con NaOH y filtrados) se mezclaron con *V. harveyi* en proporción 1:9, respectivamente, en una placa de poliestireno de 96 pocillos negra (Cell Culture Plate, NUNC®) (De Keersmaecker y Vanderleyden, 2003). La luminiscencia se midió cada 15 minutos durante 6 horas en el lector de placas Synergy System (Biotek®), el cual se encontraba a 30°C. Se cuantificó la actividad de AI-2 como Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L) (Sun y cols., 2014).

Se consideraron los siguientes controles y análisis (Tabla 2):

**Tabla 2.** Controles y muestras experimentales considerados en el ensayo de luminiscencia de *V. harveyi*.

<b>CONTROL</b>	<b>RELACIÓN 9:1</b>
<b>Blanco</b>	Medio AB + Medio MRSm Medio AB + SLC <i>L. casei</i> ATCC 4646 en medio MRSm Medio AB + SLC <i>L. casei</i> ATCC 4646 <i>luxS</i> <sup>-</sup> en medio MRSm
<b>Negativo</b>	<i>V. harveyi</i> en medio AB + Medio MRSm
<b>Positivo</b>	<i>V. harveyi</i> en medio AB + AI-2 sintetizado químicamente (en diferentes concentraciones) en medio MRSm
<b>Experimental</b>	<i>V. harveyi</i> en medio AB + SLC <i>L. casei</i> ATCC 4646 en medio MRSm <i>V. harveyi</i> en medio AB + SLC <i>L. casei</i> ATCC 4646 <i>luxS</i> <sup>-</sup> en medio MRSm

El experimento se realizó en triplicado, obteniendo el promedio y desviación

estándar en cada caso.

Para obtener las concentraciones de AI-2 presentes en cada SLC, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de AI-2 sintetizado químicamente, como se describe en Rickard y cols. (2006).

### **5.3.3 Análisis del efecto de AI-2 en el crecimiento de *Candida albicans***

Se realizaron curvas de crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 y 10231, en los medios de cultivo y condiciones descritas para cada caso, en presencia de diferentes concentraciones del SLC de *L. casei* ATCC 4646, *L. casei* ATCC 4646 *luxS*<sup>-</sup> y el estándar comercial de AI-2. Se utilizó Fluconazol como control positivo de inhibición de crecimiento.

Se registró el crecimiento, midiendo la D.O.<sub>450</sub>, en un lector de placas Synergy System (Biotek®) por 15 a 16 horas y a 28°C.

Se determinó la velocidad de crecimiento considerando los datos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento, mostradas en la figuras 5 y 7, determinando la pendiente de cada recta perteneciente a cada grupo experimental.

### **5.3.4 Análisis del efecto de AI-2 en la adhesión y formación de biopelículas de *Candida albicans***

Se añadieron 100 µL de una suspensión estandarizada de células ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) a cada pocillo de una placa de poliestireno de 96 pocillos en presencia o ausencia del SLC de *L. casei* ATCC 4646 y *L. casei* ATCC 4646 *luxS*<sup>-</sup> a distintas concentraciones. El control contuvo RPMI-1640 con FBS (10% v/v). Las placas fueron incubadas a 37 °C por 4 horas sin agitación para ensayo de adhesión y 24 horas en el caso de formación de biopelícula. Después de la incubación, las células adheridas al fondo de los pocillos fueron lavadas 2 veces con 100 µL de PBS. Luego, 135 µL de cristal violeta (0,1% p/v) fueron añadidos a cada pocillo y la mezcla fue incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y las células fueron lavadas 4 veces con PBS. Finalmente, 200 µL de ácido acético (10% v/v) fueron añadidos a cada pocillo y el sobrenadante fue leído a 590 nm en un lector de placas de 96 pocillos (Infinite F50, Tecan). Los resultados

fueron expresados como el porcentaje de adhesión relativo al grupo control con MRSm y como porcentaje de biopelícula.

Se utilizó AI-2 sintetizado químicamente a las mismas concentraciones del SLC de *L. casei* como control.

### **5.3.5 Análisis del efecto de AI-2 en la morfogénesis de *Candida albicans***

Se añadieron 100  $\mu$ L de una suspensión estandarizada de células ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y se incubaron por 4 horas con agitación (150 rpm) a 37 °C en medio RPMI-1640 con FBS (10% v/v). Las levaduras fueron incubadas en presencia y ausencia del SLC de *L. casei* ATCC 4646 y *L. casei* ATCC 4646 *luxS*<sup>-</sup> a diferentes concentraciones. Después de la incubación, el porcentaje de células en forma de hifa fue calculado como el número de hifas dividido por el total de células observados en el microscopio. Al menos, 10 cuadros microscópicos (aproximadamente 200 células) fueron observados al microscopio (aumento 40x). Las células fueron categorizadas como a) no filamentosas (menos de 3 células unidas), b) células filamentosas con hifa verdadera (no hay constricción en el septum, paredes permanecen paralelas en la hifa, y las ramas permanecen perpendiculares a las paredes celulares) o c) pseudohifa. Varias posiciones en el portaobjetos fueron examinadas para asegurar una selección representativa de células.

Se utilizó AI-2 sintetizado químicamente a las mismas concentraciones del SLC de *L. casei* como control.

### **5.3.6 Análisis estadísticos**

Los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar y fueron analizados utilizando ANOVA de una vía (GraphPad 6.0). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos para valores  $p < 0,05$ . Todos los experimentos fueron realizados al menos en triplicado en 3 días diferentes ( $n=3$ ).

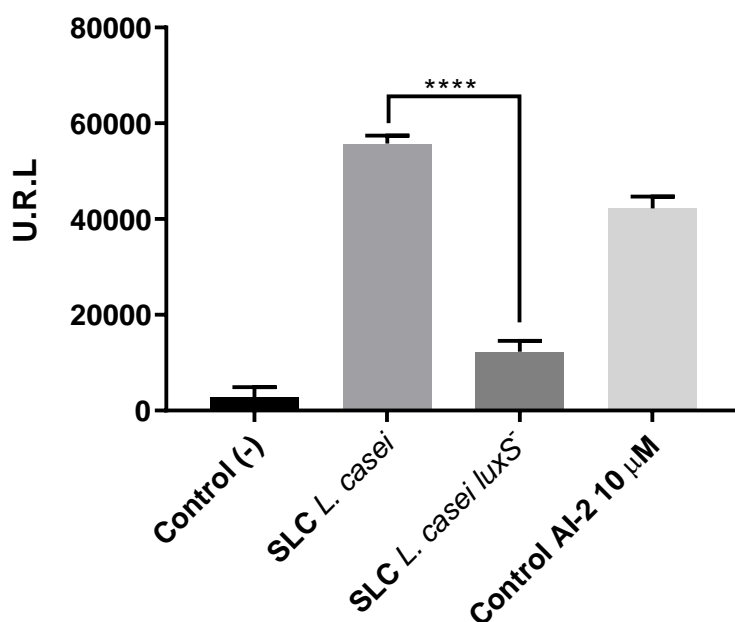


## 6. RESULTADOS

### 6.1 Presencia y funcionalidad de AI-2 proveniente de *L. casei* ATCC 4646.

Con el objetivo de medir la producción de AI-2 proveniente de *L. casei* ATCC 4646, se analizó la presencia de esta molécula en los sobrenadantes libres de células (SLC) de cultivos de este microorganismo.

Se cuantificó la actividad de AI-2 como Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L). Se observa en la Figura 3 que el SLC de *L. casei* genera mayores niveles de luminiscencia y por ende posee mayor cantidad de AI-2 que el AI-2 sintetizado químicamente de concentración 10  $\mu$ M. Por otro lado, se pudo observar que el SLC de *L. casei luxS* también posee AI-2, sin embargo, en menor medida.



**Figura 3. Análisis de la presencia de AI-2 en el SLC de *L. casei*, SLC de *L. casei luxS*.** El AI-2 sintetizado químicamente a una concentración 10  $\mu$ M se utilizó como control. Los resultados representan el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas biológicas, en triplicado (n=3). \*\*\*\* $p < 0,0001$  (prueba t de Welch).

Con el fin de determinar la cantidad de AI-2 producida por *L. casei*, se realizó una curva de calibración presentada en la Figura 4 que muestra la relación lineal que existe entre los niveles de luminiscencia producidos por *V. harveyi* a diferentes concentraciones de AI-2 sintetizado químicamente. De acuerdo con la ecuación de

la recta obtenida, se determinó la concentración de AI-2 presente en los SLC de *L. casei* y *L. casei luxS*, que fue de 13  $\mu\text{M}$  y 1,6  $\mu\text{M}$  respectivamente.

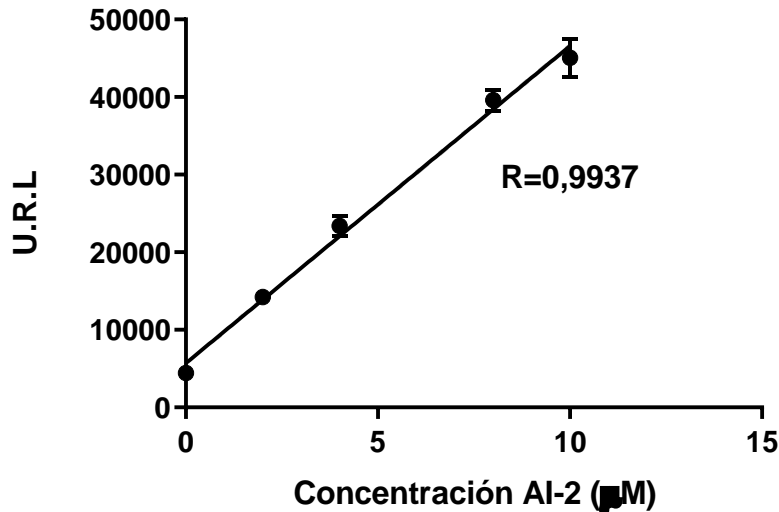
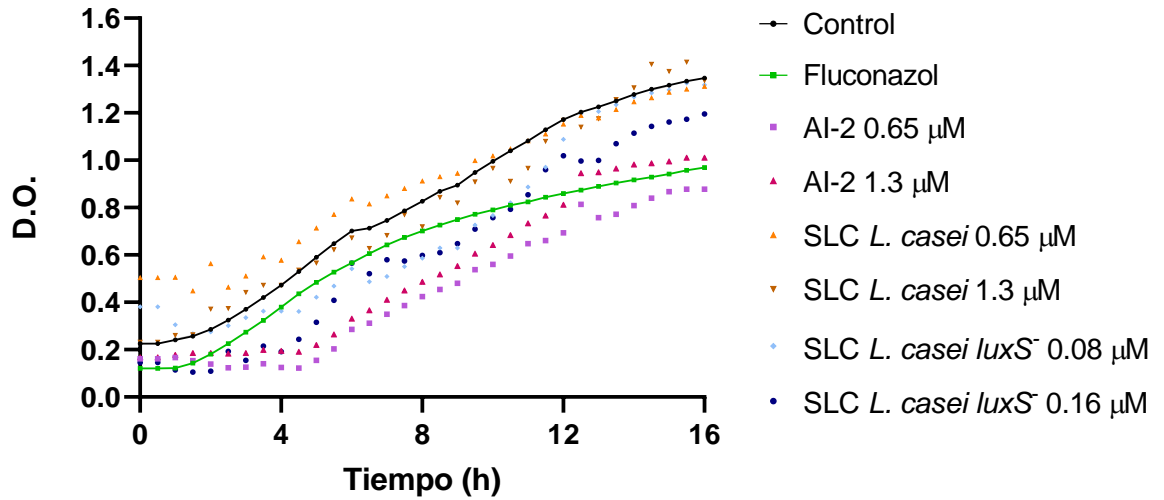


Figura 4. Curva de calibración para la relación entre la concentración de AI-2 ( $\mu\text{M}$ ) y la luminiscencia producida por *V. harveyi*. Ecuación de la recta obtenida:  $Y = 4088 \cdot X + 5715$  y  $R=0,9937$ .

## 6.2 Efecto del AI-2 en el crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231.

Para determinar el efecto del SLC de *L. casei* mediante AI-2 en el crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231, se realizaron curvas de crecimiento en ausencia y presencia del SLC de *L. casei*, mostrados en las Figuras 5 y 7 respectivamente. Se observa de manera cualitativa que el SLC de *L. casei* ATCC 4646 *luxS* inhibe parcialmente el crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 (Figura 5, curva de color celeste y azul), a diferencia del SLC de *L. casei* ATCC 4646 que no tuvo efecto sobre el crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 (Figura 5, curva de color anaranjado).

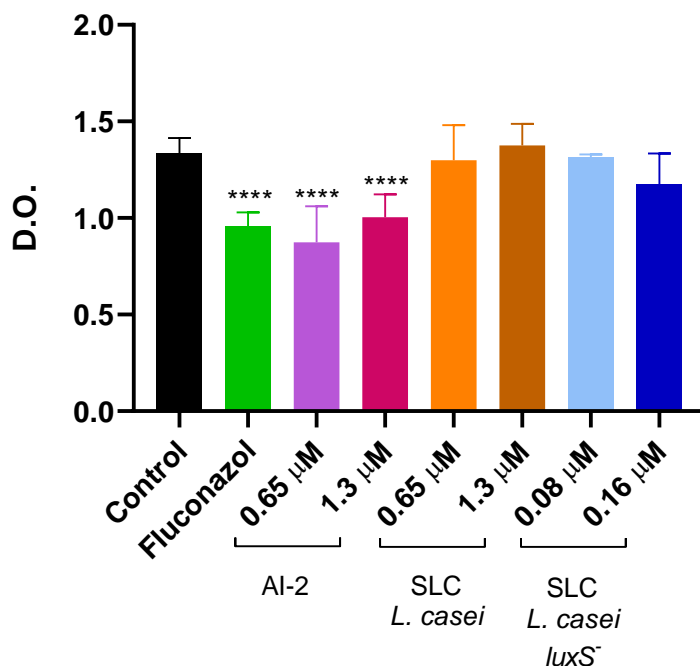
Por otro lado, AI-2 en ambas concentraciones prolongó la fase de latencia desde 1 a 5 horas aproximadamente y luego genera un crecimiento similar al obtenido en presencia de fluconazol (comparar curvas de color lila y fucsia con curva de color verde).



**Figura 5. Curvas de crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029.** Los puntos representan el promedio de 3 experimentos diferentes (n=3). D.O: densidad óptica medida a 450 nm.

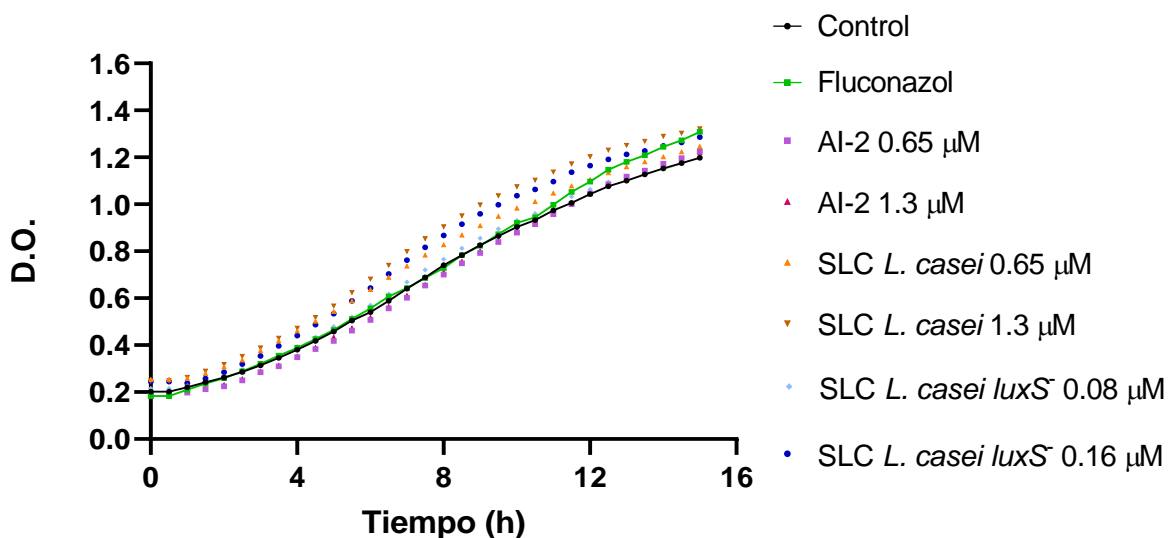
Con el propósito de cuantificar el crecimiento final de *C. albicans* ATCC 90029, se analizó el crecimiento a las 16 h en la fase estacionaria. En la Figura 6, se observa que ninguno de los SLC (*L. casei* y *L. casei luxS*<sup>-</sup>) inhibieron el crecimiento en la cepa 90029.

Por otro lado, Al-2 sintetizado químicamente en ambas concentraciones inhiben el crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 de manera similar a fluconazol, siendo este efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ).



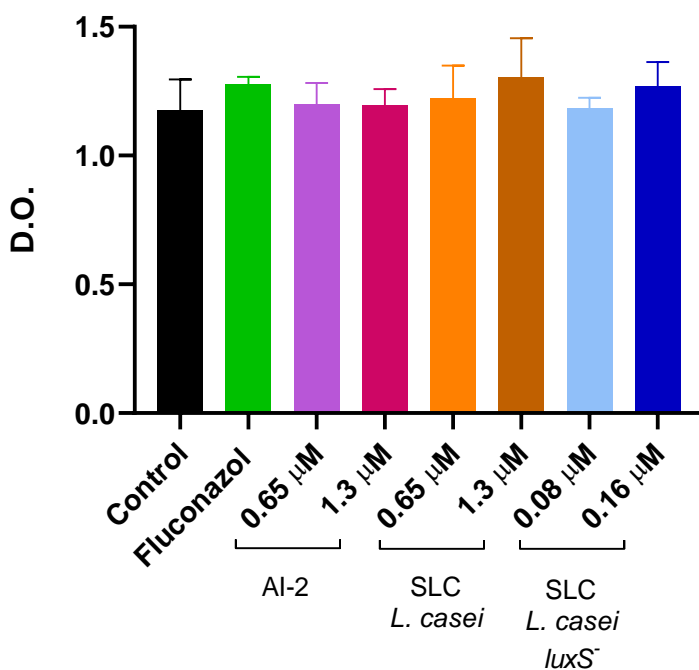
**Figura 6. Efecto del SLC en *C. albicans* ATCC 90029 a las 16 horas de crecimiento.** Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. D.O: densidad óptica medida a 450 nm. \*\*\*\* $p < 0,0001$  con respecto al control (ANOVA de una vía, test de Dunnett). Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS*<sup>-</sup> corresponden a las de AI-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4.

En cuanto al crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231, cepa resistente a fluconazol, se observa que no hubo variaciones con respecto al control, a excepción del AI-2 sintetizado químicamente, que inhibe el crecimiento de manera parcial, como se puede ver en la Figura 7 (curvas de color lila y fucsia).



**Figura 7. Curvas de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231.** Los puntos representan el promedio de 2 experimentos diferentes (n=2). D.O: densidad óptica medida a 450 nm.

En relación a la valoración del crecimiento a las 15 horas de la cepa ATCC 10231 de *C. albicans* (Figura 8), se observa que no hay efecto estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

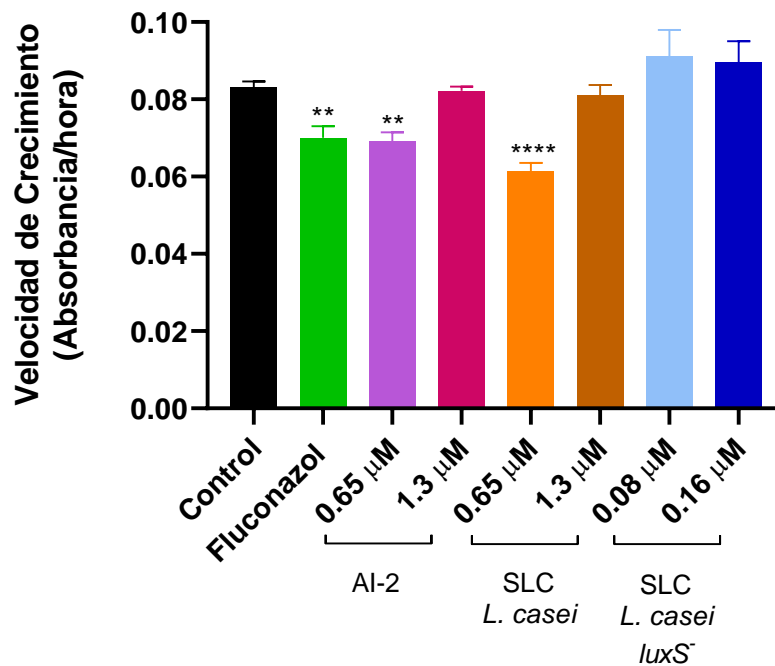


**Figura 8. Efecto del SLC en *C. albicans* ATCC 10231 a las 15 horas de crecimiento.** Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. D.O: densidad óptica medida a 450 nm. Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS*<sup>-</sup> corresponden a las de AI-

2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4.

### 6.2.1 Efecto del AI-2 sobre la velocidad de crecimiento en *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231.

Se determinó la velocidad de crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231 en la fase exponencial. Para *C. albicans* ATCC 90029, se observa que el SLC *L. casei* 0,65  $\mu\text{M}$  disminuye la velocidad de crecimiento de manera significativa ( $p < 0,0001$ ), mientras que el SLC *L. casei luxS* no presenta diferencias con respecto al control. Por otro lado, tanto fluconazol como AI-2 sintetizado químicamente 0,65  $\mu\text{M}$  también disminuyen la velocidad de crecimiento con significancia estadística ( $p = 0,0027$  y  $p = 0,0014$  respectivamente) (Figura 9).

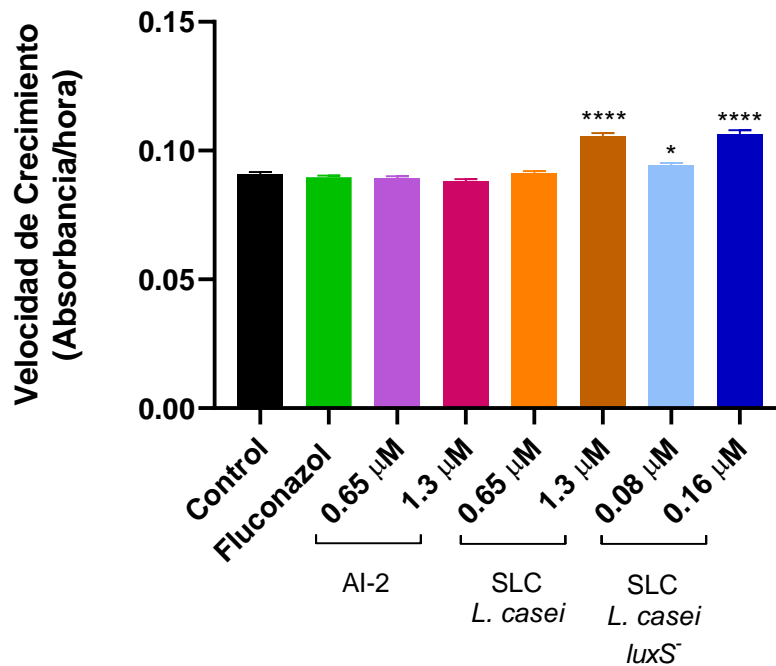


**Figura 9. Velocidad de crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 en la fase exponencial.** Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de la velocidad representada en  $\text{absorbancia/hora}$ . Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS* corresponden a las de AI-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  con respecto al control (ANOVA de una vía, test de Dunnett).

Con respecto a *C. albicans* ATCC 10231, tanto el SLC de *L. casei* con el SLC de *L. casei luxS* en su mayor concentración permiten el crecimiento a mayor velocidad y

de manera estadísticamente significativa ( $p \leq 0,0001$ ), al igual que el SLC *L. casei luxS*  $0,08 \mu\text{M}$  ( $p=0,0313$ ), sin embargo, a menor velocidad.

Por otra parte, tanto fluconazol como el AI-2 sintetizado químicamente junto con el SLC *L. casei*  $0,65 \mu\text{M}$  no tienen efecto sobre la velocidad de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 10).



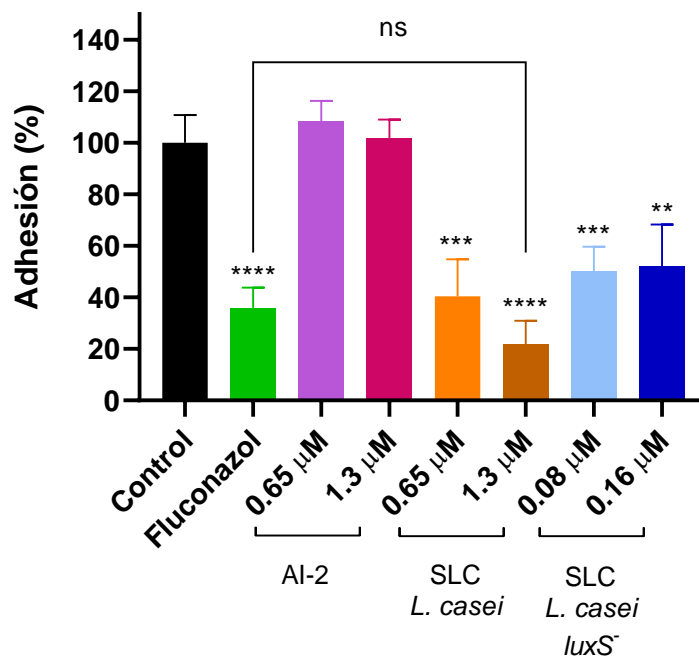
**Figura 10. Velocidad de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 en la fase exponencial.** Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de la velocidad representada en  $\text{absorbancia}/\text{hora}$ . Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS* corresponden a las de AI-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  con respecto al control (ANOVA de una vía, test de Dunnett).

### 6.3 Efecto del AI-2 en la adhesión de *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231.

Con la finalidad de determinar el efecto del SLC de *L. casei* a través de AI-2 en la adhesión *in vitro* de *C. albicans* ATCC 90029 y 10231, esta fue cuantificada en presencia y ausencia del SLC de *L. casei*. En la Figura 11 se observa que en la cepa *C. albicans* ATCC 90029, el SLC de *L. casei* en ambas concentraciones inhibe la adhesión con respecto al control presentando diferencias estadísticamente

significativas ( $p \leq 0,0001$ ). Además, esta inhibición es similar con respecto a la presentada por el control de fluconazol; sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

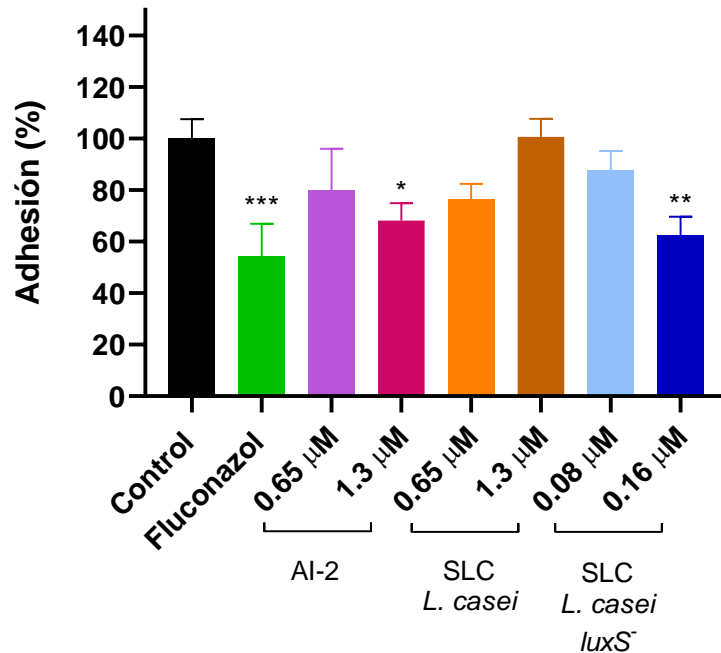
De igual manera, el SLC de *L. casei luxS* en ambas concentraciones también inhibe la adhesión, no obstante, en menor porcentaje ( $p=0,007$  y  $p=0,0011$  respectivamente). Por otro lado, AI-2 sintetizado químicamente en ambas concentraciones utilizadas no afecta la adhesión de *C. albicans* ATCC 90029.



**Figura 11. Efecto del SLC en la adhesión de *C. albicans* ATCC 90029.** Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de la cuantificación de la adhesión expresada en porcentaje (%) respecto de la condición control. Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS* corresponden a las de AI-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns: no estadísticamente significativo con respecto a fluconazol (ANOVA de una vía).

En relación a *C. albicans* ATCC 10231, se puede apreciar que el SLC de *L. casei* 0,65  $\mu$ M no inhibe de manera significativa la adhesión. Por otro lado, tanto el SLC de *L. casei luxS* 0,08  $\mu$ M y el AI-2 sintetizado químicamente 1,3  $\mu$ M inhiben en mayor porcentaje la adhesión, presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p=0,0033$  y  $p=0,0143$ ), similar a la inhibición por parte de fluconazol ( $p=0,0005$ ) (Figura 12).



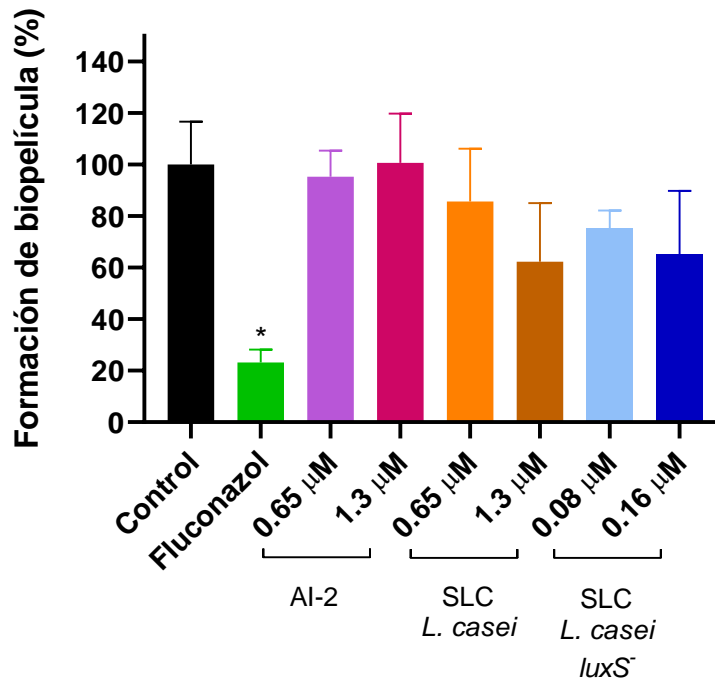


**Figura 12. Efecto del SLC en la adhesión de *C. albicans* ATCC 10231.** Las barras representan el promedio +/- desviación estándar de la cuantificación de la adhesión expresada en porcentaje (%) respecto de la condición control. Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS<sup>-</sup>* corresponden a las de AI-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al control (ANOVA de una vía).

#### 6.4 Efecto del AI-2 en la formación de biopelículas de *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231.

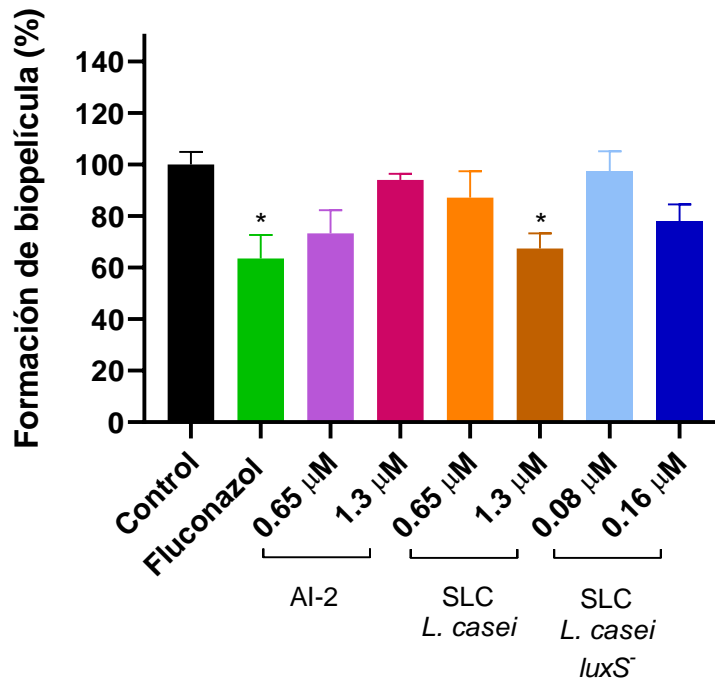
Para analizar el efecto del del SLC de *L. casei* a través de AI-2 en la formación de biopelículas de *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231, esta fue cuantificada en presencia y ausencia del SLC de *L. casei* posterior a 24 horas. En la Figura 13, podemos observar que el porcentaje de formación de biopelículas disminuye en el grupo con mayor concentración tanto del SLC de *L. casei* como del SLC de *L. casei luxS<sup>-</sup>*. Por otro lado, el AI-2 sintetizado químicamente, no interfiere en la formación de biopelícula.

Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al control ( $p > 0,05$ ).



**Figura 13. Efecto del SLC en la formación de biopelícula de *C. albicans* ATCC 90029 posterior a 24 horas.** Las barras representan el promedio +/- desviación estándar de la cuantificación de la formación de biopelícula expresada en porcentaje (%) respecto de la condición control. Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS*<sup>-</sup> corresponden a las de Al-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4. \* $p < 0,05$  con respecto al control (ANOVA de una vía).

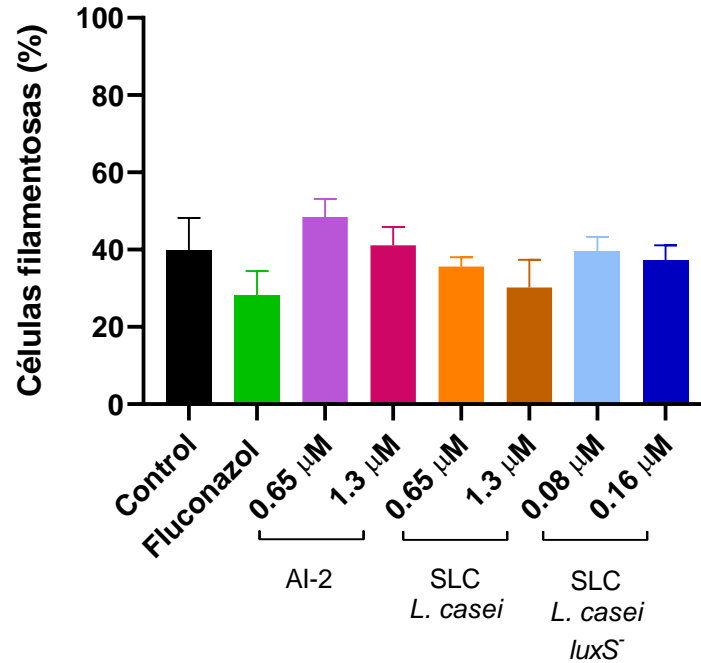
Por otra parte, en relación a la formación de biopelícula en la cepa resistente a fluconazol de *C. albicans* ATCC 10231, se puede apreciar en la Figura 14 que la mayor concentración del SLC de *L. casei* inhibe la formación de biopelícula en un porcentaje similar al control de fluconazol, presentado ambas diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento ( $p=0,0283$  y  $p=0,0150$ ).



**Figura 14. Efecto del SLC en la formación de biopelícula de *C. albicans* ATCC 10231 posterior a 24 horas.** Las barras representan el promedio +/- desviación estándar de la cuantificación de la formación de biopelícula expresada en porcentaje (%) respecto de la condición control. Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS*<sup>-</sup> corresponden a las de AI-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4. \* $p < 0,05$  con respecto al control (ANOVA de una vía).

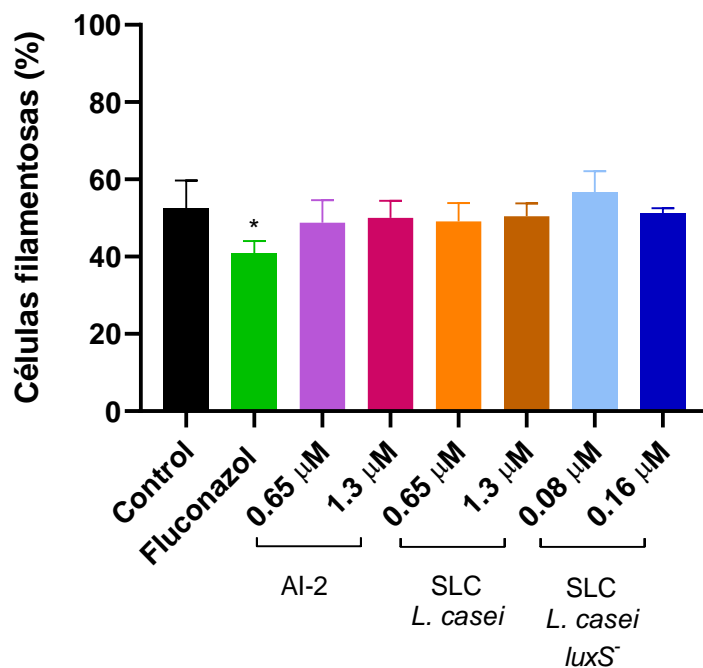
### 6.5 Efecto del AI-2 en la morfogénesis de *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231.

Con el propósito de determinar el efecto del del SLC de *L. casei* por intermedio de AI-2 en la morfogénesis de *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231, se clasificaron las células en filamentosas y no filamentosas. En la Figura 15 se observa que el porcentaje de células filamentosas de *C. albicans* ATCC 90029 disminuye al estar expuesto al SLC de *L. casei*, y en menor medida tanto al SLC de *L. casei luxS*<sup>-</sup>. Por otro lado, el AI-2 sintetizado químicamente en ambas concentraciones no presenta efecto. Sin embargo, no se presentan diferencias estadísticamente significativas de los grupos experimentales con respecto al control ( $p > 0,05$ ).



**Figura 15. Efecto del SLC en la morfogénesis de *C. albicans* ATCC 90029.** Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del porcentaje (%) de células filamentosas relativo al número total de células. Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS*<sup>-</sup> corresponden a las de AI-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4. (ANOVA de una vía, test de Dunnett).

De manera similar, en la cepa resistente a fluconazol *C. albicans* ATCC 10231, no se observan variaciones con significancia estadística en el porcentaje de células filamentosas de los grupos experimentales con respecto al control ( $p > 0,05$ ) (Figura 16).



**Figura 16. Efecto del SLC en la morfogénesis de *C. albicans* ATCC 10231.** Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del porcentaje (%) de células filamentosas relativo al número total de células. Las concentraciones presentadas en el SLC de *L. casei* y el SLC *L. casei luxS*<sup>-</sup> corresponden a las de AI-2 presentes en los SLC de acuerdo a lo presentado en la figura 4. \* $p < 0,05$  con respecto al control (ANOVA de una vía, test de Dunnett).

## 7. DISCUSIÓN

*Candida* spp. coexiste con numerosas especies microbianas en la mucosa del hospedero, donde establece interacciones complejas que no se han logrado reportar a cabalidad (Polke y cols., 2015). Dentro de ellas, se encuentra una forma de comunicación celular denominada *quorum sensing*, la cual a través de la molécula de AI-2, reportada en microorganismos orales, ha demostrado tener efectos sobre la formación de biopelículas, regulación de genes y por lo tanto conducir a cambios en la población de especies microbianas presentes en el entorno oral (Guo y cols., 2014).

Si bien existe evidencia acerca de la interacción a través de *quorum sensing* mediado por AI-2 entre otras bacterias con *C. albicans*, como por ejemplo *A. actinomycetemcomitans* (Bachtiar y cols., 2014) y también *S. gordonii* (Bamford y cols., 2009), hasta ahora, no hay evidencia que explique el efecto que posee *L. casei* por medio de esta molécula de señalización celular sobre *C. albicans*. Por lo tanto, el objetivo de nuestro estudio fue determinar la participación de AI-2 producido por *Lactobacillus casei* ATCC 4646 en el crecimiento, morfogénesis, adhesión y formación de biopelículas de *Candida albicans* ATCC 90029 y 10231.

La producción de AI-2 por bacterias pertenecientes a la cavidad oral ha sido reportada para 19 especies pertenecientes a 12 géneros distintos de microorganismos orales, considerando tanto bacterias Gram positivo como Gram negativo (Rickard y cols., 2006; Rickard y cols., 2008).

Por medio del ensayo de bioluminiscencia de *Vibrio harveyi*, el cual produce bioluminiscencia como respuesta a la detección de AI-2, es que se pudo detectar la presencia del sistema de *quorum sensing* mediado por la vía LuxS/AI-2 funcional (De Keersmaecker y Vanderleyden, 2003; Taga y Xavier, 2011). Esta cepa reportera posee dos moléculas de señalización que controlan la bioluminiscencia, AI-1 y AI-2. Sin embargo, en la cepa BB170 utilizada en este estudio, se encuentra mutado el sensor para AI-1, por lo cual responde únicamente a la señal de AI-2 (Bassler y cols., 1993).

Cabe señalar que el valor de la luminiscencia es usado para reflejar la actividad y

presencia de AI-2, sin embargo, no puede ser utilizado para su cuantificación directa. Para este propósito, por medio de una curva de calibración se obtuvieron las concentraciones de AI-2 correspondientes.

De este modo, en primer lugar, se determinó que la cepa *L. casei* ATCC 4646 es capaz de producir y secretar AI-2 al medio externo, lo cual fue identificado en un estudio previo realizado en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral (Villarreal, 2018) y además confirmado en la presente investigación.

Sin embargo, en este estudio, la cepa *L. casei* ATCC 4646 *luxS*<sup>-</sup> que posee una mutación en el gen *luxS*, también posee AI-2 en el SLC, aunque en menor cantidad (Figura 3). Este fenómeno se podría explicar indagando acerca de las vías de síntesis de AI-2. A la fecha, se han propuesto dos vías de síntesis de AI-2. En primer lugar, la vía convencional describe a una etapa del Ciclo Metilo Activado, en donde a partir de S-Ribosil-Homocisteína (SRH), la enzima LuxS la convierte en homocisteína y dihidroxil-1-2,3-pentanediona o DPD el cual isomeriza en distintas moléculas de AI-2 (Schauder y cols., 2001; Sun y cols., 2004). No obstante, hay evidencia que sugiere que AI-2 puede ser producido por una vía independiente de LuxS, en donde la ribulosa-5-fosfato, intermediario de la vía del metabolismo de las pentosas fosfato, podría convertirse espontáneamente en AI-2 en microorganismos que no presenten el gen *luxS* (Tavender y cols., 2008).

Posterior a la confirmación de la producción de AI-2 por *L. casei*, se procedió a determinar si efectivamente los factores de patogenicidad de *C. albicans* se ven inhibidos por esta molécula.

Para la colonización de las superficies pertenecientes a la cavidad oral por *C. albicans*, la formación de biopelícula es crucial. *In vitro*, esta ocurre a través de la adhesión inicial de las células a una superficie y posteriormente ocurren eventos como crecimiento celular, agregación bacteriana, formación de hifas o pseudohifas y la eventual maduración de la biopelícula (Chandra y cols., 2001)

En este estudio, en *C. albicans* ATCC 90029 se observó que el crecimiento es

inhibido de manera significativa por AI-2 sintetizado químicamente y fluconazol ( $p < 0,0001$ ). La velocidad de crecimiento también es disminuida significativamente con fluconazol ( $p < 0,01$ ), AI-2 sintetizado químicamente ( $p < 0,01$ ) y el SLC de *L. casei* ATCC 4646 en la menor concentración utilizada en este estudio ( $p < 0,0001$ ).

Liao y cols. (2019) desarrollaron un método mediante superposición de agares que permite a *C. albicans* estar expuesto a los metabolitos producidos por *L. casei* y no permanecer en contacto directo con la bacteria. Los resultados demostraron que en presencia del cultivo de *L. casei*, las unidades formadoras de colonias (UFC) y el tamaño promedio de las colonias de *C. albicans* estaban disminuidos con respecto al control. De esta forma, se demostró que el crecimiento de *C. albicans* fue afectado directamente por los metabolitos de *L. casei* difundidos a través del medio. Si bien la metodología difiere de la realizada en este estudio, es un antecedente que respalda la inhibición del crecimiento a través de metabolitos.

Por otro lado, no hay efecto en el crecimiento final de *C. albicans* ATCC 10231, cepa resistente a fluconazol (Figura 8). Además, la velocidad de crecimiento es aumentada frente a los SLC de *L. casei* ( $p < 0,05$ ) y *L. casei luxS-* ( $p < 0,0001$ ), lo que podría atribuirse a ciertos componentes del SLC que estén estimulando el crecimiento, potenciando este factor de virulencia.

Sin embargo, no se encontraron estudios del crecimiento de *C. albicans* y el efecto producido por el SLC de *L. casei*. Por lo tanto, a la fecha, este es el único estudio que ha evaluado el crecimiento de *C. albicans* bajo estas condiciones.

La adhesión a las células del hospedero es el primer paso en la patogénesis de *C. albicans*, permitiendo colonizar un nicho específico e iniciar el desarrollo de la infección (Ribeiro y cols., 2019).

Por medio del ensayo de adhesión, en la cepa de *C. albicans* ATCC 90029, los SLC ejercieron un efecto inhibitorio significativo; sin embargo, no atribuible a AI-2 (Figura 11).

En este caso, se puede inferir que existen otros elementos presentes en el SLC que



estén ejerciendo un efecto inhibitor de la adherencia y que estén predominando por sobre AI-2.

Con respecto al efecto producido por estas moléculas sobre la adhesión de *C. albicans*, en un estudio de Matsubara y cols. (2016), se evaluó el efecto de los SLC de *L. rhamnosus* en las fases del desarrollo de la biopelícula, correspondientes a adhesión (0-90 min), colonización inicial (90 min-24 horas) y maduración (24-48 horas) determinados por ensayo de reducción de XTT. Estos mostraron inhibición sólo en la fase inicial del desarrollo de la biopelícula y no en la fase de maduración, lo que se condice con los resultados encontrados en nuestro estudio.

Cabe destacar que el ensayo de adhesión realizado en esta investigación consideró un tiempo de incubación de 4 horas, por lo que podría asemejarse a la etapa de colonización inicial considerada en el estudio de Matsubara y cols. (2016), y además fue realizado mediante ensayo de cristal violeta a diferencia de la metodología utilizada de ensayo de reducción de XTT.

Esto indica que los efectos de los sobrenadantes pueden ser fisicoquímicos y modificar la energía superficial de las levaduras de *C. albicans*, previniendo que formen un estructura más organizada (Ceresa y cols., 2015) a través de exometabolitos que pueden incluir peróxido de hidrógeno, elementos protéicos, componentes de bajo peso molecular como ácidos grasos y biosurfactantes con actividad antimicrobiana (Orsi y cols., 2014; Vilela y cols., 2015; Matsubara y cols., 2016; Ribeiro y cols., 2019).

Mientras que en los resultados en la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 indican que hay una respuesta específica dependiente de la cepa frente a AI-2 y otros elementos presentes en el SLC de *L. casei*, ya que AI-2 sintetizado químicamente y el SLC de *L. casei luxS-* presentaron efecto inhibitorio significativo sobre la adhesión (Figura 12).

En relación con el ensayo de formación de biopelícula, analizado posterior a 24 horas, no se reportó efecto significativo en la cepa de *C. albicans* ATCC 90029 (Figura 13); mientras que para la cepa ATCC 10231 solo se reportó efecto en el SLC de *L. casei* (Figura 14).

Estos resultados difieren de lo presentado por otros estudios que, mediante el uso del SLC de distintas bacterias probióticas, demostraron un efecto inhibitorio para la formación de biopelícula de *C. albicans* (Orsi y cols., 2014; Vilela y cols., 2015; James y cols. 2016; Matsubara y cols., 2016), lo que indicaría que el efecto ejercido es dependiente de la cepa probiótica utilizada.

La formación de biopelícula y la virulencia están relacionados a la habilidad que *C. albicans* posee para pasar de una forma de crecimiento de levadura a hifa (Gow y cols., 2002).

A pesar de que en este estudio se encontró que el porcentaje de células filamentosas disminuyó frente a los SLC de *L. casei* y *L. casei luxS*<sup>-</sup>, estas diferencias no fueron significativas en *C. albicans* ATCC 90029 ni atribuidas a la acción de AI-2 (Figura 15). Por otro lado, no hubo efecto en *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 16). Al respecto, un estudio realizado por Bamford y cols. (2009), demuestra que moléculas de señalización como AI-2 producidas por *S. gordonii* podrían ser detectadas por *C. albicans* e inducir un cambio fisiológico, potenciando la formación de hifas.

Además, diversas señales del medio son capaces de afectar la morfología de *C. albicans*. Por ejemplo, a bajo pH (<6), las células de *C. albicans* crecen en forma de levadura, mientras que a alto pH (>7), se induce la formación de hifa. Estos datos sugieren que las cepas de *Lactocaseibacillus* acidifican el pH del medio al punto de que es capaz de reducir la formación de hifas (Mayer y cols., 2013).

Sin embargo, durante la preparación de los SLC de *L. casei* se neutralizó el pH, por lo que puede ser un factor que facilite la formación de hifas y es por este antecedente que no se evidencie efecto inhibitorio en el ensayo de morfogénesis para ambas cepas de *C. albicans*.

Por otro lado, otros autores encontraron que bacterias probióticas como *L. acidophilus* mediante su SLC eran capaces de inhibir el número de hifas producidos por *C. albicans*, sugiriendo la producción de sustancias con actividad antifúngica (Vilela y cols., 2015). Asimismo, Rossoni y cols. (2017) observaron la interacción entre

diferentes cepas de bacterias probióticas, como *L. rhamnosus*, *L. paracasei* y *L. fermentum* con *C. albicans* y se determinó que *L. rhamnosus* fue la cepa que produjo mayor reducción del número de hifas comparado con el grupo control (57%), seguido por *L. fermentum* (31%) y *L. paracasei* (17%). Ambos resultados fueron obtenidos mediante el mismo método utilizado en este estudio correspondiente a microscopía óptica.

Es probable que, como se ha mencionado anteriormente, la producción de bacteriocinas, ácido láctico u otros metabolitos sean responsables de reducir el número de hifas y por consiguiente afectar los factores de virulencia de *C. albicans*. Lo que sugiere que el aislar ciertas moléculas de *Lactocaseibacillus* podría dar luces de qué está ejerciendo exactamente el efecto antifúngico, pese a que esté mediado también por interacción directa (Rossoni y cols., 2017; Ribeiro y cols., 2019).

De acuerdo a los antecedentes presentados, se puede concluir que el efecto inhibitorio ejercido por AI-2 sobre *C. albicans* es dependiente de la cepa bacteriana de la cual provenga, el contexto en donde se encuentre esta molécula y también el microorganismo con el que esté interactuando.

Luego de analizar los resultados obtenidos en general, es posible afirmar que la presencia de AI-2 proveniente de *L. casei* no se puede relacionar directamente con los efectos inhibitorios que observamos sobre ciertos procesos de patogenicidad de *C. albicans*, siendo variables dependiendo de la cepa utilizada.

De acuerdo con lo anterior, se rechaza la hipótesis planteada en esta investigación.

## 8. CONCLUSIONES

En este estudio se analizó si *L. casei* ATCC 4646 a través de AI-2 funcional influencia el crecimiento, adhesión, morfogénesis y formación de biopelículas de *C. albicans* ATCC 90029 y 10231, lo cual hasta la fecha no ha sido descrito como interacción entre *Lacticaseibacillus* y *C. albicans*.

Por lo tanto, se concluye que:

- El crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 y 10231 no se ve afectado en presencia de sobrenadantes de cultivo que contienen AI-2 de *L. casei* ATCC 4646 y *L. casei* ATCC 4646 *luxS*.
- La adhesión de *C. albicans* ATCC 90029 se ve afectada por los sobrenadantes de cultivo que contienen AI-2 de *L. casei* ATCC 4646 y *L. casei* ATCC 4646 *luxS*; sin embargo, no atribuible a AI-2. No se observa efecto en *C. albicans* ATCC 10231.
- La formación de biopelículas *in vitro* y la morfogénesis de *C. albicans* ATCC 90029 y 10231 no se ven inhibidas en presencia de sobrenadantes de cultivo que contienen AI-2 de *L. casei* ATCC 4646 y *L. casei* ATCC 4646 *luxS*.

En base a lo anteriormente expuesto, la hipótesis planteada en este estudio es rechazada.

Por otra parte, estos resultados sugieren que este sistema de comunicación celular entre *L. casei* ATCC 4646 y *C. albicans* ATCC 90029 y 10231, mediante AI-2, influenciaría algunos procesos de los factores de virulencia de *C. albicans* de manera cepa-dependiente.

En este contexto, se requieren más estudios para saber exactamente los mecanismos exactos usados por *Lacticaseibacillus* o AI-2 en la inhibición de *Candida* spp.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque P, Casadevall A (2012). Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol* 50:337–345.
- Allonsius CN, Vandenneuvel D, Oerlemans EF, Petrova MI, Donders G y cols. (2019). Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Sci Rep* 9:2900.
- Atriwal T, Azeem K, Husain FM, Hussain A, Khan MN y cols. (2021). Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. *Front Microbiol* 12:638609.
- Bachtiar EW, Bachtiar BM, Jarosz LM, Amir LR, Sunarto H y cols. (2014). AI-2 of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. *Front Cell and Infect Microbiol* 4:94.
- Badet C, Thebaud N (2008). Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J* 2:38–48.
- Bamford CV, d’Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM y cols. (2009). *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect Immun* 77:3696–3704.
- Buck B, Azcarate-Peril M, Klaenhammer T (2009). Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 107:269–279.
- Ceresa C, Tessarolo F, Caola I, Nollo G, Cavallo M y cols. (2015). Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *J Appl Microbiol* 118:1116–1125.

- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T y cols. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 183:5385–5394.
- Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L (2020). The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence* 11:337–348.
- d'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, Chakraborty S, Cole N y cols. (2021). The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 45(3).
- Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y y cols. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microb Pathog* 117:128–138.
- DeKeersmaecker S, Vanderleyden J (2003). Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiol* 149:1953–1956.
- Dewhirst F, Chen T, Izard J, Paster B, Tanner A y cols. (2010). The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192:5002–5017.
- Gow N, Brown A, Odds F (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 5:366–371.
- Guo L, He X, Shi W (2014). Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Front Microbiol* 5:328.
- Hall R, Turner K, Chaloupka J, Cottier F, De Sordi L y cols. (2011). The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 10:1034–1042.

- Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C y cols. (2018). The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol* 9:2107.
- Ishikawa KH, Mayer MP, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG y cols. (2015). A multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers: Reduction of candida by probiotics. *J Prosthodont* 24:194–199.
- Jakubovics N, Kolenbrander P (2010). The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms: Formation of oral biofilms. *Oral Dis* 16:729–739.
- James KM, MacDonald KW, Chanyi RM, Cadieux PA, Burton JP (2016). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and modulation of gene expression by probiotic cells and supernatant. *J Med Microbiol* 65:328–336.
- Klinke T, Kneist S, de Soet J, Kuhlisch E, Mauersberger S y cols. (2009). Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res* 43:83–91.
- Lewis MA, Williams DW (2017). Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J* 223:675–681.
- Liao H, Liu S, Wang H, Su H, Liu Z (2019). Enhanced antifungal activity of bovine lactoferrin-producing probiotic *Lactobacillus casei* in the murine model of vulvovaginal candidiasis. *BMC Microbiol* 19:7.
- Matsubara VH, Wang Y, Bandara HMHN, Mayer MPA, Samaranayake LP (2016). Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:6415–6426.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4:119–128.

- McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, Barbieri B, Cook GS y cols. (2003). LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 185:274–284.
- Mundula T, Ricci F, Barbetta B, Baccini M, Amedei A (2019). Effect of probiotics on oral candidiasis: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 11:2449.
- Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, Foster KR (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol* 6:e14.
- Nogueira F, Sharghi S, Kuchler K, Lion T (2019). Pathogenetic impact of bacterial-fungal interactions. *Microorganisms* 7:459.
- Orsi CF, Sabia C, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia RG y cols. (2014). Inhibitory effects of different lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. *J Biol Regul Homeost Agents* 28:743–752.
- Padder SA, Prasad R, Shah AH (2018). Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiol Res* 210:51–58.
- Patel M (2022). Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the Development of Infection. *Pathogens* 11:335.
- Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP (2021). *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol* 47:91–111.
- Rémy B, Mion S, Plener L, Elias M, Chabrière E y cols. (2018). Interference in bacterial quorum sensing: A biopharmaceutical perspective. *Front Pharmacol* 9:203.



- Ribeiro FC, Rossoni RD, de Barros PP, Santos JD, Fugisaki LRO y cols. (2020). Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. *J Appl Microbiol* 129:175–185.
- Rickard AH, Campagna SR, Kolenbrander PE (2008). Autoinducer-2 is produced in saliva-fed flow conditions relevant to natural oral biofilms. *J Appl Microbiol* 105:2096–2103.
- Rickard AH, Palmer Jr RJ, Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF y cols. (2006). Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol* 60:1446–1456.
- Roemer T, Krysan DJ (2014). Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4:a019703–a019703.
- Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, Ribeiro F de C, Velloso MDS y cols. (2018). Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling* 34:212–225.
- Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule: AI-2 biosynthesis. *Mol Microbiol* 41:463–476.
- Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, Lynch SV, Kapila YL (2021). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontol 2000* 87:107–131.
- Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut C (2020). A review of the role of probiotic supplementation in dental caries. *Probiotics Antimicrob Proteins* 12:1300–1309.

- Song YG, Lee SH (2017). Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on Candida biofilm of denture surface. *Arch Oral Biol* 76:1–6.
- Spampinato C, Leonardi D (2013). Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Res Int* 204237.
- Su H, Han L, Huang X. (2018). Potential targets for the development of new antifungal drugs. *J Antibiot* 71:978–991.
- Sun J, Daniel R, Wagner-Döbler I, Zeng AP (2004). Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* 4:36.
- Sun Z, He X, Brancaccio VF, Yuan J, Riedel CU (2014). Bifidobacteria exhibit LuxS-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation. *PloS One* 9:e88260.
- Taga ME, Xavier KB (2011). Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. *Curr Protoc Microbiol* 23:1C.1.1-1C.1.15.
- Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S y cols. (2021). *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi (Basel)* 7:79.
- Tavender TJ, Halliday NM, Hardie KR, Winzer K (2008). LuxS-independent formation of AI-2 from ribulose-5-phosphate. *BMC Microbiol* 8:98.
- Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA (2020). Oral candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi (Basel)* 6:15.

- Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MC y cols. (2015). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence* 6:29–39.
- 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, U. de Chile.
- Wade WG (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 69:137–143.
- Wright C, Burns L, Jack A, Back C, Dutton L y cols. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol* 28:83–101.
- Yamashita Y, Takeshita T (2017). The oral microbiome and human health. *J Oral Sci* 59:201–206.
- Zhao J, Quan C, Jin L, Chen M (2018). Production, detection and application perspectives of quorum sensing autoinducer-2 in bacteria. *J Biotechnol* 268:53–60.
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM y cols. (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*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:2782–2858.

## 10. ANEXOS Y APÉNDICES

### 10.1 Anexo 1



#### 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/vcm.