



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

**FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE UN AISLADO CLÍNICO ORAL DE
Candida albicans EN CONDICIONES LIMITANTES Y CON EXCESO DE
AZÚCAR**

CAMILA VALENTINA ORELLANA BELTRÁN

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRINCIPAL

TUTORA

Dra. Carla Lozano M.

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/08
y FIOUCH 0322
Santiago, Chile
2023**



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

**FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE UN AISLADO CLÍNICO ORAL DE
Candida albicans EN CONDICIONES LIMITANTES Y CON EXCESO DE
AZÚCAR**

CAMILA VALENTINA ORELLANA BELTRÁN

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Carla Lozano M.

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/08
y FIOUCH 0322
Santiago, Chile
2023**

DEDICATORIAS

A mis padres, que estuvieron presentes desde inicio a fin.
Todo esto fue gracias a su gran esfuerzo y perseverancia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi casa de estudios, la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y a todos sus docentes por acogerme, enseñarme y ser parte de mi proceso de formación. Claramente este es uno de los periodos más importantes de mi vida, sin embargo, para llegar hasta aquí tuve que pasar por momentos difíciles, de estrés y frustración, pero no me cabe duda de que todo valió la pena. Muchas gracias mi querida Universidad de Chile por permitirme cumplir mi sueño, que desde octavo básico fue ser “dentista”.

Agradezco también al PRI-ODO 2020/08 y FIOUCH 0322 que otorgaron los recursos para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Agradezco a los docentes que conformaron mi comisión evaluadora, Dra. Claudia Lefimil, Dra. Francisca Sandoval y Dr. Juan Francisco Sánchez. Además, al Dr. Rodrigo Giacaman y Natalia García (Universidad de Talca), por facilitarnos el uso del micro indentador que fueron de vital importancia para esta investigación. Gracias por su tiempo y buena disposición.

Quiero agradecer profundamente a la doctora Carla Lozano, mi tutora quien es una admirable docente de la facultad, ella siempre estuvo dispuesta a ayudarme y aconsejarme. Se caracteriza por tener una gran vocación e infinita paciencia a la hora de enseñar, además de ser una persona muy noble y solidaria. Gracias por todo el tiempo que dedicó a esta investigación, sin usted nada hubiera sido posible. Espero haber sido un aporte en su larga trayectoria y le deseo de corazón mucho éxito personal, familiar y profesional. También agradezco a todo el gran equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral.

No puedo dejar de agradecerle a mis padres. Gracias por nunca soltarme la mano, por apoyarme desde el día uno en que tome la decisión de venirme a Santiago a cumplir mis sueños, gracias por creer en mí cuando incluso ni yo creía.

Agradezco a mi Mamá Rosa Beltrán, quien me llamaba todos los días para saber cómo estaba, para darme ánimo y aliento cuando todo se veía muy complicado. Me enseñaste que puedo lograr todo lo que me proponga con esfuerzo, constancia y dedicación.

Agradezco a mi Papá Carlos Orellana, quien me enseñó que el límite no existe, quien estuvo cuando quería soltar los brazos, quien dejó de lado sus preferencias por apoyar mi decisión.

Gracias a ambos por estar siempre, porque sé que, aunque tenga momentos difíciles siempre voy a contar con ustedes, por eso esto es por y para ustedes. Espero que estén tan orgullosos de mí, como yo estoy de ustedes. Gracias nuevamente, porque nunca me cansaré de agradecerles su apoyo incondicional.

Agradezco a mi hermana Carla Orellana, por preocuparse de mí y darme siempre sus mejores deseos. Quiero que sepas que siempre estaré para ti, como tú lo estás para mí. Deseo que cumplas todos tus sueños y que encuentres en mí un apoyo incondicional.

Agradezco a mi compañero Matías Ormazabal su cariño y constante apoyo. Gracias por alentarme, cuidarme y protegerme en los momentos difíciles. Quiero que sepas que muchas veces fuiste mi inspiración y la razón más fuerte para crecer como persona. Todos los días aprendo algo de ti y espero de todo corazón que al igual que yo, cumplas todos tus sueños. Estoy demasiado orgullosa y feliz de ver todo lo que has logrado. Te veo y sigo viendo a ese hombre simpático, autentico y humilde que conocí hace muchos años. No hace falta decirlo pero estoy segura que serás siempre así y eso es lo que te hizo llegar donde estás y donde llegarás, que sé que será mucho más arriba. Deseo estar y caminar al lado tuyo siempre.

A mi abuela María Flor Farias por sus buenos deseos y a mi abuelo Hernán Beltrán, quien rezaba todas las noches para que todo mi esfuerzo se viera plasmado en buenas calificaciones. Gracias a ambos por cuidarme y quererme sin esperar nada a cambio.

A mis tías/tíos gracias por cada llamada de aliento.

Agradezco enormemente a mis amigos de la facultad, pocos pero muy buenos. Patricio Miranda, Nicolás Osorio y Paula Rojas, con ustedes compartí muchos momentos de sufrimiento y nervios, pero también muchos momentos de felicidad. Gracias por darme la tranquilidad de que en ustedes iba a encontrar una amistad sincera, sin envidia y rencor. Les deseo todo el éxito del mundo, espero que esta unión nunca se acabe y que nos sigamos viendo en el futuro. Quiero recordarles que serán unos increíbles profesionales.

Y finalmente pero no menos importante, la familia que yo elegí, mis compañeros de hogar por estos largos 6 años, Javiera Gamboa, Priscilla Moraga y Jaime Oyarzún. Fueron un pilar fundamental en este proceso, gracias por no permitirme caer, gracias por escucharme y comprenderme. Gracias por hacer mi estadía más agradable, con su buena conversación y sus ricas onces. Espero que esas eternas conversaciones que teníamos en la mesa se nos hagan costumbre una vez que nos separemos. Son tremendas personas y es por eso que quiero conservar su amistad fuera del #1003. Desearles también toda la felicidad y éxito del mundo en todos los ámbitos de la vida, porque nadie más que ustedes se lo merece.

Por todos ustedes y por mí seguiré creciendo y aprendiendo todos los días de mi vida. Los quiero muchísimo a todos.

Camila Valentina Orellana Beltrán.

ÍNDICE GENERAL

I.	RESUMEN	9
II.	INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	11
	II.1 INTRODUCCIÓN	11
	II.2 MARCO TEÓRICO	12
	1. Definición de caries dental y Epidemiología	12
	2. Microbiología de la Cavidad Oral	13
	3. Levaduras del género <i>Candida</i>	15
	4. Pregunta de investigación	18
III.	HIPÓTESIS	19
IV.	OBJETIVOS	19
	1. Objetivo general	19
	2. Objetivo específicos	19
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
	1. Microorganismos y condiciones de crecimiento	20
	2. Preparación de bloques de esmalte	20
	3. Modelo de biopelícula mono especie	21
	3.1. Parámetros biológicos	22
	3.2. Parámetros Químicos	23
	3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	24
	4. Análisis estadístico	24
VI.	RESULTADOS	25
VII.	DISCUSIÓN	31
VIII.	CONCLUSIONES	39
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
X.	ANEXOS	47

RESUMEN

Introducción: Las patologías orales son uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial, siendo la caries dental la enfermedad más prevalente. La caries dental es una enfermedad crónica, no transmisible, mediada por biopelículas (modulada por azúcares), multifactorial y dinámica, que conduce a la desmineralización y remineralización de los tejidos duros del diente. Se acepta que la principal causa de esta enfermedad es la disbiosis polimicrobiana de la biopelícula dental. Históricamente, se consideraba como principal agente causal de esta enfermedad a la bacteria *Streptococcus mutans*, sin embargo, estudios recientes han descrito la participación de varios microorganismos e interacciones entre grupos bacterianos y levaduras.

La levadura *Candida albicans* forma parte de la gran diversidad microbiana presente en la cavidad oral. Su principal factor de virulencia es su capacidad de transformación de forma ovoide a hifa en diferentes condiciones ambientales. Este microorganismo puede comportarse como comensal en condiciones de salud oral, pero si ocurre un cambio en el microambiente (como alta concentración de azúcar) se comporta como un patobionte pudiendo ejercer un rol en el proceso de caries. En esta investigación determinamos los parámetros biológicos y químicos asociados a la formación de biopelículas mono especie de un aislado clínico oral de *C. albicans* en condiciones limitantes y de exceso de azúcar en un modelo de caries *in vitro*.

Materiales y métodos: Se utilizó un aislado clínico oral de *C. albicans* proveniente de saliva de niños en edad preescolar libres de caries.

Sobre bloques de esmalte de bovino se desarrollaron las biopelículas de levadura, estas fueron expuestas durante 5 minutos 3 veces al día y durante 5 días a una solución de sacarosa al 10% (imita una condición cariogénica) y a NaCl al 0,9% (control negativo de caries), lo cual representa un modelo de caries *in vitro*. Se determinaron parámetros biológicos (viabilidad y formación de hifas) y parámetros

químicos (pH y porcentaje de desmineralización), además de observación en microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las variables se expresaron en promedios y desviación estándar y fueron analizados mediante estadística paramétrica, excepto la viabilidad que se expresó en mediana utilizando estadística no paramétrica. Los experimentos se realizaron dos veces de manera independiente.

Resultados: Los parámetros biológicos, viabilidad y filamentación, no obtuvieron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre ambas condiciones (NaCl y sacarosa) en biopelículas mono especie de *C. albicans*. En cambio, los parámetros químicos sí obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$), el porcentaje de desmineralización fue mayor en la condición sacarosa y las variaciones de pH fueron más bajas en la misma condición respecto a la condición NaCl.

En cuanto a las imágenes obtenidas por SEM, se observó que la cantidad de células de la levadura y de hifas se presentaron en mayor cantidad en la condición sacarosa respecto a la condición NaCl, aunque la cuantificación de estos parámetros no presentó diferencias significativas entre ambas condiciones analizadas.

Conclusiones: Los resultados obtenidos nos indican que hay contribución del aislado clínico oral de *C. albicans* en el inicio del proceso de formación de caries dental cuando el ambiente es cariogénico.

En esta investigación la viabilidad y filamentación de la levadura no se vieron afectadas en presencia de exceso de azúcar, sin embargo, *C. albicans* contribuiría al mantenimiento de un pH salival bajo (acidez), el cual está asociado con una mayor desmineralización del esmalte dental, lo que conlleva al desarrollo de lesiones de caries.

II. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

II.1 INTRODUCCIÓN

Para determinar correctamente una estrategia preventiva y tratamiento de las lesiones de caries dental, es de suma importancia comprender su concepto. La caries dental es una enfermedad crónica no transmisible, altamente prevalente en la población, que resulta de la pérdida de la red de minerales que conforman los tejidos duros del diente. Su etiología es compleja y multifactorial, lo que significa que deben concurrir varios factores en su desarrollo. Hasta el momento las investigaciones han logrado determinar cuatro factores fundamentales, anatomía del diente, tiempo, dieta y bacterias (Machiulskiene y cols., 2020). Si bien este último factor participa, poco se habla de otros microorganismos presentes en la cavidad oral como por ejemplo, el hongo *Candida albicans*.

Este hongo, del tipo levadura, es dimórfico el cual presenta hifas, pseudohifas y blastoconidios subesféricos (Kadosh, 2019). Se caracteriza por ser un patobionte, esto es debido a sus factores de virulencia, en especial el de su versatilidad morfológica de cambiar su forma ovoide a filamentos o hifas.

Hasta ahora, no se conoce el rol que tiene *C. albicans* como microorganismo comensal o como patobionte en el desarrollo de lesiones de caries, solo se han descrito sus factores de virulencia los cuales podrían influir en el proceso. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es analizar la capacidad de formación de biopelícula de esta levadura en un medio con exceso de azúcar, que representa una condición cariogénica, y en un medio limitante de azúcar, que representa la condición de salud oral no cariogénica.

II.2 MARCO TEÓRICO

1. Definición de Caries Dental y Epidemiología

Las patologías orales son uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial, siendo la caries dental la enfermedad más prevalente. En la mayoría de los países industrializados, entre el 60 y 90% de los niños y la gran mayoría de los adultos están afectados por caries (Revisado en Pitts y cols., 2017). En Chile, según el estudio realizado por el MINSAL en el año 2018, el 54,6% de los adultos presenta lesiones de caries cavitadas y esta prevalencia es mayor a medida que aumenta la edad (MINSAL, 2018).

La enfermedad de caries tiene un impacto en la salud, en el desarrollo y la calidad de vida de las personas que la padecen. Esta enfermedad crónica, no contagiosa y prevenible, tiene una etiología compleja y multifactorial. Aunque generalmente se acepta que la biopelícula es el motor principal del proceso de la enfermedad (Nyvad y cols., 2013), se tiene conocimiento que el desarrollo de una lesión cariosa requiere de la interacción de varios factores dependientes del hospedero (superficie del diente), microbiota cariogénica y tiempo. Es decir, ocurre como resultado de una alteración de la microbiota oral en respuesta a cambios en el microambiente o disbiosis (Simón-Soro y Mira, 2015), que pueden ser provocados por una deficiente higiene oral o un aumento en el consumo de alimentos ricos en carbohidratos fermentables, quienes se encargan de generar acidez en el medio y una consecuente desmineralización del esmalte dental. Además, hay una contribución de factores biológicos y no biológicos, tales como la edad, genética, estilos de vida, conductas y nivel socioeconómico influyendo en este proceso.

Históricamente, el modelo de la enfermedad de caries se basaba en el estudio de la bacteria *Streptococcus mutans* y especies del género *Lactobacillus* como principales causantes de esta disbiosis. Sin embargo, la cavidad oral alberga una comunidad microbiológica compleja muy diversa, donde se han observado

interacciones intra y entre dominios, tales como, dentro de esta última, entre eucariotas (hongos y levaduras) y bacterias (Cruz-Quintana y cols., 2017).

2. Microbiología de la Cavidad Oral

La biopelícula o *biofilm* se define como una comunidad heterogénea de microorganismos de distinta naturaleza que se adhieren a superficies vivas o inertes y que pueden estar inmersos en una matriz extracelular (MEC) que ellos mismos secretan (Harriot y Noverr, 2011). Uno de los componentes de la MEC son los exopolisacáridos (EPS), estos son sintetizados por enzimas microbianas, que en algunos casos se denominan glucosiltransferasas, los cuales se encargan de darle integridad funcional y estructura a la biopelícula.

En la cavidad oral, la biopelícula se forma sobre una membrana de composición química compleja y heterogénea llamada película salival adquirida (PSA). La PSA, que está unida a la superficie del diente o esmalte dental, está compuesta por proteínas, lípidos y glúcidos que se encargan de proveer sitios para la adhesión de microorganismos y así comenzar el proceso de colonización sobre éste (Buscher y Van der Meri, 2000).

En condiciones de salud oral es posible encontrar gran diversidad de especies. Se han encontrado alrededor de 700 especies distintas siendo los géneros bacterianos más prevalentes *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Lactobacillus* y *Rothia*, entre otros (Chen y cols., 2010). El género *Streptococcus* se encuentra en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y lengua. Las especies del género *Actinomyces* se encuentran a nivel supragingival, subgingival y en fisuras de la lengua. Sin embargo, las bacterias del género *Veillonella* y *Neisseria* han sido aisladas en todos los hábitats orales (Cruz-Quintana y cols., 2017).

Los microorganismos denominados comensales participan en diversas funciones en el organismo humano, como por ejemplo modulan el sistema inmune. Se ha descrito que los microorganismos interactúan entre sí dentro de una comunidad, algunos tienden a coexistir, mientras que otros se evitan entre sí, siendo la biopelícula el hábitat ideal para las bacterias, ya que es un sitio pobre en oxígeno, rico en nutrientes con excelente humedad y temperatura (Rosier y cols., 2014).

Por otro lado, la saliva es un líquido secretado por las glándulas salivales fundamental para mantener la integridad de los tejidos orales, participa en la lubricación, proporciona iones para la remineralización de los dientes, su capacidad tamponante contrarresta los efectos dañinos de los ácidos, coopera en la masticación y deglución, además tiene poder antibacteriano gracias a la acción de las inmunoglobulinas A que actúan como anticuerpos salivales (Struzycka, 2014). Este fluido viscoso que se caracteriza por tener pH entre 6,5 y 7,0, varía en función de los estímulos presentes en la cavidad oral. Después de un consumo constante de azúcares fermentables como glucosa, fructosa o sacarosa, estos azúcares comienzan a metabolizarse en ácidos generando que el pH disminuya considerablemente, contribuyendo de esta manera en la desmineralización del esmalte dental. Adicionalmente, este pH ácido en la biopelícula inhibe el crecimiento de muchas bacterias asociadas a salud oral, lo que resulta en una disminución de la diversidad microbiana (Revisado en Oviedo y cols., 2014) y en un aumento de la cantidad de bacterias acidogénicas y acidúricas, incluido *S. mutans* y especies de los géneros *Lactocaseibacillus*, *Actinomyces* y *Bifidobacterium*, entre otras (Takahashi y Nyvad, 2008).

Durante décadas, *S. mutans* fue considerado el principal microorganismo causante de la caries dental, objetivando estudios y estrategias terapéuticas. Sin embargo, estudios recientes sobre el ADN y ARN obtenido desde lesiones de caries concluyen que *S. mutans* forma solo una pequeña fracción de todas las especies involucradas en el desarrollo de caries, descubriendo así que este proceso es más complejo de lo que se pensaba (Simón-Soro y Mira, 2015).

3. Levaduras del género *Candida*

Dentro de la gran diversidad microbiana en la cavidad oral, se ha descrito la presencia de hongos del tipo levaduras, el género más prevalente y más ampliamente estudiado es *Candida*, el cual cuenta con más de 150 especies, siendo la más frecuente *C. albicans*, cuya principal característica y factor de virulencia es su capacidad de transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas (De Oliveira Santos y cols., 2018), en diferentes condiciones ambientales.

Las levaduras del género *Candida* pueden comportarse temporalmente como microorganismo comensal en condiciones de salud oral, pero si esta condición se altera es capaz de actuar como patógeno oportunista o patobionte (Simón- Soro y Mira, 2015).

Estudios han descrito la presencia del género *Candida* en biopelículas polimicrobianas asociadas a estomatitis, mucositis, enfermedades periodontales, infección del sistema de canales radiculares y en lesiones de caries dental. En ensayos *in vitro* se ha observado que la presencia de *C. albicans* en biopelículas duales con *S. mutans*, aumenta la producción de EPS, de modo que las especies acumulan más biomasa en la biopelícula y albergan más células (Falsetta y cols., 2014). Es importante conocer los tipos de interacciones entre levaduras *Candida* y bacterias, para obtener una mejor comprensión del complejo microbioma oral tanto en salud o en enfermedad, como por ejemplo en el inicio o desarrollo de lesiones de caries dental (Negrini y cols., 2019).

Por otro lado, *C. albicans* libera farnesol, una molécula ligada a la comunicación célula-célula y que participa como respuesta al daño oxidativo. El farnesol además, bloquea la transición morfológica del estado levaduriforme al estado filamentoso (hifas) disminuyendo su adhesión a la biopelícula (Cao y cols., 2017).

Estudios indican que la prevalencia de esta levadura en lesiones de caries de dentina en niños presenta frecuencias que van de un 66% a un 97% (Pereira y cols., 2018). Sin embargo, su función o rol al inicio o en la progresión de la lesión de caries aún es incierto. Es de suma importancia responder esta interrogante, ya que la especie *C. albicans* en condiciones de disbiosis (DeGruttola y cols., 2016) actúa como patobionte produciendo moléculas que son capaces de desmineralizar la dentina y a su vez liberar calcio al medio (De La Calle Rodríguez y cols., 2012). No se ha concluido si en el esmalte ocurre lo mismo, puesto que son superficies con diferente contenido mineral. Por lo que sería interesante analizar, ¿Cómo impacta el exceso de azúcar (imitación de una condición cariogénica), en la viabilidad, transición morfológica de la levadura y su consecuente formación de biopelículas?

Además, *Candida* spp. presenta varios rasgos de virulencia que podrían influir en el desarrollo de caries, como la adhesión a la superficie de los dientes y la colonización de la mucosa oral debido al aumento de la formación de hifas; la capacidad que presenta de fermentar carbohidratos y la producción de enzimas extracelulares tales como aspartil proteinasas, fosfolipasas y lipasas, que son críticas para la colonización e inducción de enfermedad, contribuyendo así a su patogenicidad (De La Calle Rodríguez y cols., 2012).

Respecto a su capacidad de fermentar carbohidratos, se ha descrito que *C. albicans* puede escindir y producir ácidos a partir de estos, como lo son ácidos carboxílicos de cadena corta como piruvatos y formiatos. Además, se observó que las células de la levadura sobrevivieron incluso después de 72 horas en un medio muy ácido, el cual presentó un valor de pH de 3,0 (Revisado en Farkash y cols., 2019). La reducción del pH en la biopelícula conduce a una cascada de eventos, entre ellos, se activan proteasas, fosfolipasas y colagenasas del hospedero. Las colagenasas y proteasas (activas en un medio ácido) pueden degradar el colágeno presente en la MEC de la dentina en una lesión de caries dentinaria, mientras que las fosfolipasas pueden ayudar a la levadura a penetrar profundamente en la dentina a través de los túbulos dentinarios (Li y cols., 2014).

Los postulados clásicos de Koch establecen que existen microorganismos específicos responsables en el inicio de una enfermedad infecciosa cuando estos invaden el hospedero y estos no están presentes en la condición de salud (Revisado en Castro y cols., 2017). Con todos los antecedentes mencionados previamente, es posible decir con certeza que los postulados de Koch no son aplicables, ya que se tiene conocimiento que la caries dental no es una enfermedad infecto-contagiosa, sino que es el resultado de una disbiosis polimicrobiana (Hosainzadegan y cols., 2020). Con lo anterior se puede concluir que se necesita una comprensión más profunda de la patogenia de la enfermedad de caries dental, sin centrarse exclusivamente en microorganismos patobiontes como por ejemplo *S. mutans*. De esta manera, lograríamos ampliar el conocimiento que se tiene de la interacción bacteriano-fúngicas en biopelículas.

Para lograr resultados más cercanos a lo que ocurre en la situación clínica, es necesario disponer de microorganismos que provengan de los ambientes naturales en donde se desenvuelven (en este caso, cavidad oral). Por lo tanto, el uso de cepas o aislados clínicos de *C. albicans* obtenidas desde este microambiente es fundamental para comprender el complejo escenario de las interacciones microbianas existentes en las biopelículas, ya que se ha reportado en la literatura que cepas clínicas se comportan distinto a cepas de referencia o silvestres debido a diferencias a nivel fenotípico y genotípico, esto es, que presentan necesidades nutricionales, propiedades fisiológicas y bioquímicas diferentes, entre ellas la resistencia o sensibilidad a antimicrobianos (Núñez y cols., 2009; Fuentes y cols., 2014; Rojas y cols., 2020).

Dependiendo de los resultados que se obtengan se podrán plantear nuevas y mejoradas estrategias preventivas y terapéuticas contra la enfermedad de caries basadas no solo en objetivos bacterianos, sino también en la inclusión de hongos en las biopelículas orales.

Los experimentos propuestos en este trabajo son para comprender preliminarmente, parámetros biológicos del desarrollo de biopelículas de *C. albicans* (como viabilidad y formación de hifas) y parámetros químicos (como pH o

acidogenicidad y desmineralización del esmalte dental), en un modelo de caries *in vitro* utilizando bloques de esmalte de bovino, en condiciones limitantes de azúcar (imitando salud oral o caries negativo) y en exceso de azúcar (imitando una condición cariogénica).

4. Pregunta de investigación

¿Cómo es la capacidad del aislado clínico oral de *Candida albicans* en la formación de biopelículas, en cuanto a viabilidad y filamentación (parámetros biológicos) y, por otro lado, la producción de ácidos, cuya consecuencia es la baja de pH, y la desmineralización del esmalte dental (parámetros químicos) en condiciones limitantes y de exceso de azúcar?

III. HIPÓTESIS

En biopelículas mono especie del aislado clínico oral de *Candida albicans* existen diferencias en los parámetros biológicos (células viables y filamentación), químicos (pH y porcentaje de desmineralización del bloque de esmalte) y en la estructura de la biopelícula en condiciones limitantes y con exceso de azúcar en un modelo de caries *in vitro*.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los parámetros biológicos (células viables y filamentación), químicos (pH y porcentaje de desmineralización del bloque de esmalte) y observar la estructura de biopelícula mono especie de un aislado clínico oral de *Candida albicans* en condiciones limitantes y de exceso de azúcar en un modelo de caries *in vitro*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Cuantificar los parámetros biológicos (recuento de células viables y número de hifas) asociados a la formación de biopelículas mono especie del aislado clínico oral de *Candida albicans* en condiciones limitantes y con exceso de azúcar en un modelo de caries *in vitro*.

2.2 Cuantificar los parámetros químicos (pH y porcentaje de desmineralización del bloque de esmalte) asociados a la formación de biopelículas mono especie del aislado clínico oral de *Candida albicans* en condiciones limitantes y con exceso de azúcar en un modelo de caries *in vitro*.

2.3 Observar la estructura de la biopelícula mono especie del aislado clínico oral de *Candida albicans* en condiciones limitantes y con exceso de azúcar en un modelo de caries *in vitro*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Experimental.

1. Microorganismos y condiciones de crecimiento: Se utilizó un aislado clínico oral de la levadura *C. albicans* proveniente de saliva de niños en edad preescolar libres de caries (código ICDAS II = 0) denominada P25-4 (obtenida previamente de un proyecto Fondecyt N°3120164 de la Dra. Lozano).

Los cultivos individuales de la levadura crecieron en medio Sabouraud Dextrosa (SD; Oxoid) en condiciones de aerobiosis a 37°C por 18 h. Para el desarrollo de biopelículas mono especie se utilizó el medio Yeast Nitrogen Base (YNB; BD), el cual fue suplementado con glucosa o sacarosa de acuerdo con el diseño experimental mencionado en el ítem 3.

2. Preparación de bloques de esmalte: Se prepararon según Díaz-Garrido y cols. (2016). Brevemente, los bloques de esmalte se obtuvieron de dientes incisivos de bovino (estos últimos fueron donados por el Dr. Rodrigo Giacaman, co-investigador del Proyecto FIOUCH 0322), los cuales se desinfectaron con NaOCl al 5% y almacenaron en timol al 0,1 % (no más de 30 días). Primero, se extrajeron los tejidos blandos que rodean al diente con bisturí, posteriormente separamos la raíz de la corona para obtener el tamaño de los bloques de esmalte con un disco diamantado utilizando micromotor (modelo EX203, NSK, Japón). Los bloques de esmalte utilizados tenían un tamaño de 4 mm x 7 mm x 1 mm y fueron pulidos con discos soflect de manera secuencial (Soflect, 3M-ESPE, St. Paul, MN, EE. UU). Una vez obtenidos los bloques de esmalte, se les cuantificó la microdureza superficial (inicial, SH_i) con tres indentaciones lineales a través de un microindentador Knoop (402 MVD, Wolpert Wilson Instruments, Norwood, EE. UU.), a 50 g por 5 s. Para homogeneizar la variabilidad de los bloques, sólo se incluyeron aquellos con microdureza superficial de alrededor de 360 ± 30 Kg/mm² (n=24). Posteriormente, los bloques se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min.

3. Modelo de biopelícula mono especie.

Diseño experimental: Se realizaron biopelículas mono especie, utilizando un modelo de caries *in vitro* validado, según está descrito en Díaz-Garrido y cols. (2016), con modificaciones. Brevemente, como sustrato para el desarrollo y formación de biopelículas se utilizaron bloques de esmalte de bovino. Estos últimos fueron recubiertos por saliva humana filtrada (filtros de 0,22 μ M; Merck Millipore) mezclada con buffer de adsorción AB 1X (KCl 50 mM, KPO₄ 1 mM [K₂HPO₄ 0,35 mM y KH₂PO₄ 0,65 mM], CaCl₂·2H₂O 1 mM, MgCl₂·6H₂O 0,1 mM, pH 6,5) e inhibidor de proteasa PMSF a una concentración final de 0,1 M, durante 30 min a 37°C para formar la película salival adquirida. La saliva proviene de sujetos sanos oralmente que permanecieron en ayunas de 10-12 horas (adquirida previamente en un proyecto Fondecyt N°3120164 de la Dra. Lozano). Posteriormente, los bloques de esmalte fueron suspendidos verticalmente en placas de cultivo de 24 pocillos mediante alambres de ortodoncia fijados con resina (ver figura 1). Cada uno de los pocillos contenía 2 mL de medio YNB suplementado con una solución de sacarosa al 10% pH 6, para permitir la fase de adherencia inicial de la biopelícula durante 10 h a 37°C con agitación suave en condiciones de capnofilia e inoculado con la levadura a una concentración final de 1×10^7 células/mL. Adicionalmente, se agregó suero fetal bovino (SFB; Gibco, Nueva York, EE. UU.) al 10% para permitir el desarrollo de hifas en la biopelícula de la levadura. Los pre-cultivos de la levadura crecieron en YNB hasta obtener una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,38. Posterior a la etapa de adherencia de las biopelículas, a éstas se les permitió madurar en medio YNB suplementado con 0,1 mM de glucosa (concentración basal de glucosa en saliva) (Ccahuana-Vasquez y Cury, 2010) por 12 h a 37°C en condiciones de capnofilia. Durante los 5 días posteriores, los bloques de esmalte con las biopelículas mono especie de *C. albicans* fueron expuestos durante 5 min, tres veces al día a una solución de sacarosa al 10% pH 6 (simula un ambiente cariogénico, es decir, con exceso de azúcar) o a NaCl al 0,9% como condición negativa de caries (condición control) e incubados a 37°C, en condiciones de capnofilia. Luego de cada una de las exposiciones diarias, los bloques con las biopelículas fueron lavados con NaCl al 0,9% y regresados a la placa de cultivo

previa, la cual contenía medio YNB suplementado con 0,1 mM de glucosa. Este medio fue reemplazado 2 veces al día, después de la primera exposición del día y después de la última exposición diaria.

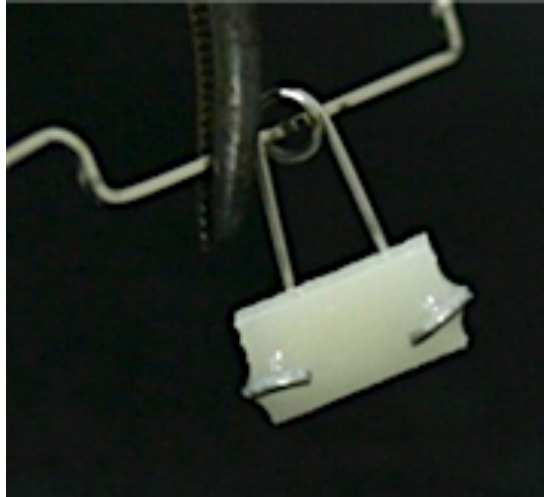


Figura 1: Fotografía representativa de los bloques de esmalte de bovino a utilizar en el modelo de caries *in vitro*. Cada bloque fue mantenido de forma vertical en los pocillos con medio de cultivo suspendidos mediante alambres de ortodoncia.

Luego de completar los 5 días de exposiciones, se determinaron parámetros biológicos y químicos, además de visualización mediante microscopía, los cuales se detallan a continuación:

3.1 Parámetros Biológicos:

A. Recuento de células viables de la levadura: Al término de la fase experimental, los bloques de esmalte expuestos a sacarosa o a NaCl, se retiraron y se transfirieron a un tubo estéril con 1 mL de NaCl al 0,9%. Las biopelículas se dispersaron utilizando un vortex (Heidolph, REAX 2000) a máxima velocidad. Se retiró el bloque y se obtuvo una solución que contenía la biomasa proveniente de los bloques, a la cual le llamamos “solución madre”, esta se diluyó seriadamente en NaCl al 0,9% y se sembraron 100 μ L de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} v/v por duplicado en placas de Petri

con medio SD suplementado con agar al 1,5%. Las placas se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 48 h para el desarrollo de colonias de la levadura. El recuento de levadura se expresó en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) (Lozano y cols., 2017). La cuantificación se realizó por sextuplicado en dos experimentos independientes (n=12).

B. Cuantificación de la formación de hifas: Se realizó de acuerdo a do Rosário Palma y cols. (2019). Brevemente, se esparcieron 50 µL de la “solución madre”, proveniente de biopelículas mono especie de *C. albicans* desde ambas condiciones, sobre un portaobjetos de vidrio y se observaron al microscopio óptico (modelo Standard 20, CarlZeiss, Alemania) a 40X de aumento. Se cuantificaron las hifas presentes en diez campos microscópicos por portaobjetos, para posteriormente calcular un promedio. La cuantificación se realizó por sextuplicado en dos experimentos independientes (n=12).

3.2 Parámetros Químicos:

A. Determinación de pH en biopelículas mono especie (como indicador de acidogenicidad): El pH se determinó según Lozano y cols. (2019). Las mediciones se realizaron dos veces al día en el medio utilizado durante los 5 días de tratamiento, por la mañana después del cultivo nocturno (antes de la primera exposición diaria) y por la noche (después de la última exposición diaria). Estas mediciones se realizaron con un microelectrodo (modelo ST46.842, Hanna Instruments, Italia) acoplado con un pH-metro (modelo PL-600, EZDO-OMEGA, China) desde cada pocillo en ambas condiciones. La cuantificación se realizó por doce duplicados en dos experimentos independientes (n=24).

B. Desmineralización del bloque de esmalte: La desmineralización de los bloques de esmalte de las biopelículas de la levadura fue estimada por el parámetro de Knoop SH (microdureza superficial) descrito en Díaz-Garrido y cols. (2016). Brevemente, para obtener el porcentaje de desmineralización de los bloques de esmalte primero

se determinó la microdureza superficial inicial (SH_i), como se describió anteriormente en el punto 2 de este ítem. Después de la fase experimental de 5 días, se cuantificó la microdureza superficial final al realizar nuevamente tres indentaciones lineales separadas de 100 μm entre sí, las cuales fueron consideradas como SH_f , adyacentes a las indentaciones iniciales. El porcentaje de pérdida de microdureza superficial (%SHL) se calculó mediante la siguiente ecuación: $(\text{promedio } SH_i - \text{promedio de } SH_f) \times 100 / \text{promedio } SH_i$. El resultado de %SHL se interpretó como % de desmineralización. La cuantificación se realizó por doce duplicados en dos experimentos independientes (n=24).

3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM): Las biopelículas mono especie de la levadura fueron formadas en portaobjetos circulares de vidrio, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente y fueron analizadas para observar la estructura de las biopelículas en ambas condiciones experimentales, fijadas en glutaraldehído al 0,1% para su procesamiento mediante microscopía electrónica de barrido (JEOL JSM IT300LV, Tokio, Japón), servicio ubicado en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las imágenes obtenidas fueron analizadas de forma descriptiva.

4. Análisis estadístico

Las variables estudiadas de las biopelículas mono especie de *Candida albicans* son su recuento de células viables, filamentación, determinación de pH y desmineralización del bloque de esmalte dental. Se utilizó el test Shapiro Wilk para analizar el tipo de distribución de los datos. Todas las variables anteriormente mencionadas se expresaron como promedios y desviación estándar, las cuales fueron analizadas mediante test estadístico paramétrico t-test no pareado, excepto la variable viabilidad, la cual presentó distribución no normal, utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon. Las observaciones y análisis de la estructura de las biopelículas mono especie fueron realizadas de forma descriptiva.

Para todos estos análisis, se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue menor o igual a 0,05. Se utilizó el software Graphpad Prism 6.0.

VI. RESULTADOS

1. Efecto de sacarosa sobre la viabilidad de *C. albicans* en biopelículas mono especies.

Como se observa en la Figura 2, la viabilidad de la levadura, aunque tendió a ser mayor en la condición con sacarosa respecto a la condición control (NaCl), la diferencia entre el recuento de células viables entre ambas condiciones analizadas no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Los recuentos al no presentar una distribución normal fueron agrupados comparando las medianas. Estos valores fueron de $8,8 \times 10^5$ con un rango de $3,6 \times 10^5 - 2,6 \times 10^6$ en la condición control y de $1,2 \times 10^6$ con un rango de $2,4 \times 10^5 - 5,3 \times 10^6$ en la condición de sacarosa.

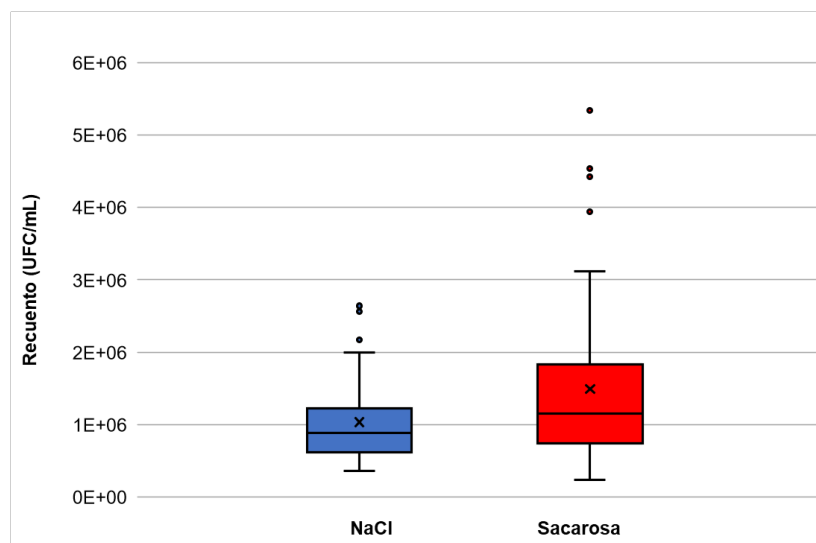


Figura 2. Efecto de sacarosa sobre la viabilidad de *C. albicans* en la biopelícula mono especies. Se muestra un gráfico de caja y bigotes que representa la mediana de la viabilidad de la levadura en la condición control y en la condición sacarosa (diluciones realizadas en NaCl 0,9%) de dos experimentos independientes ($n=12$). Las barras de error muestran el rango y los puntos representan los datos atípicos que salen de la mediana. Prueba de Wilcoxon, $p > 0,05$.

2. Efecto de sacarosa sobre la filamentación de *C. albicans* en biopelículas mono especies.

El recuento de hifas en la levadura que se observa en la Figura 3, demuestra que en la condición control fue ligeramente mayor que en la condición sacarosa, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$), con un promedio de $5,31 \pm 2,56$ y $4,42 \pm 1,47$, respectivamente.

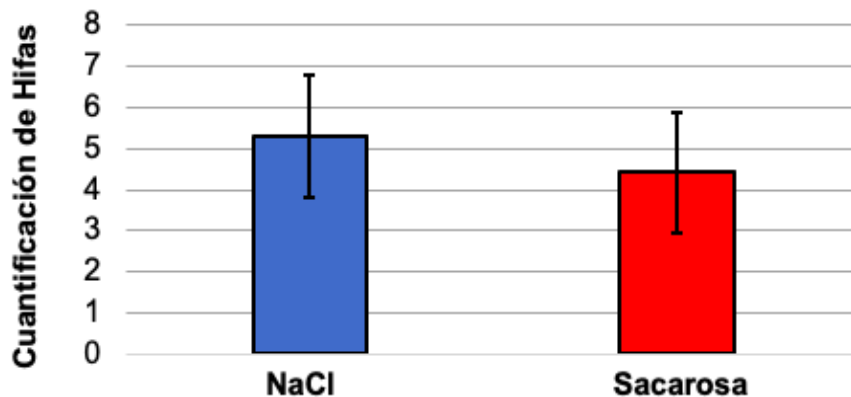


Figura 3. Efecto de sacarosa sobre el número de hifas que presenta la levadura. Las barras indican el promedio de dos experimentos independientes ($n=12$). Las barras de error muestran la desviación estándar. T-test, $p > 0,05$.

3. Efecto de sacarosa en el pH de biopelículas mono especies de *C. albicans*.

En la Figura 4 se observa el promedio de los valores de pH (representa la acidogenicidad) de las biopelículas mono especie de *C. albicans* en condiciones limitantes y con exceso de azúcar. Las biopelículas expuestas a la condición de sacarosa presentaron mayor acidogenicidad en comparación a las biopelículas expuestas a la condición de NaCl. El valor promedio de pH fue similar en ambas condiciones hasta aproximadamente las 22 h del inicio del experimento ($p > 0,05$) y a partir de las 30 h hasta el término de los ensayos, se observa una disminución significativa del pH en la condición con sacarosa versus la condición con control ($p < 0,05$). La mayor acidogenicidad en la condición con sacarosa fue un pH de 4,18

$\pm 0,42$ a las 102 h del inicio del experimento, mientras que el pH más bajo en la condición control de limitación de azúcar fue $5,25 \pm 0,33$ transcurridas las 126 h.

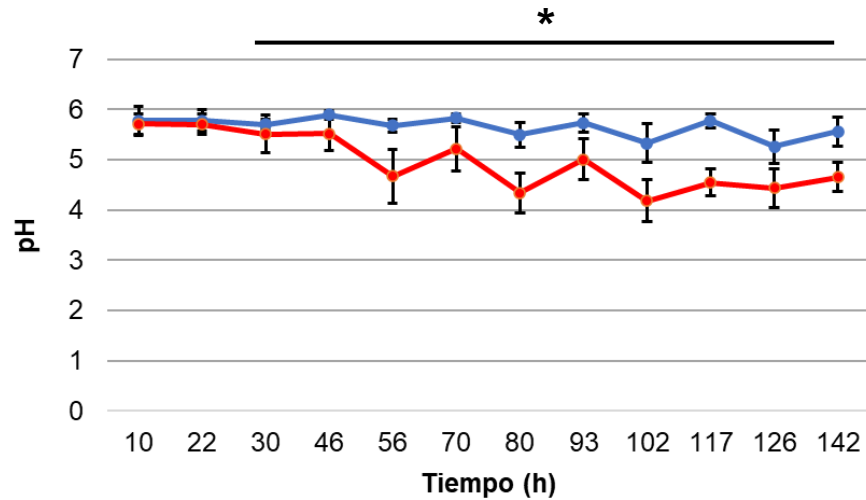


Figura 4. Variaciones de pH durante el transcurso del experimento (142 h) de biopelículas mono especie de *C. albicans*. La línea azul representa la condición control y la línea roja la condición de sacarosa de dos experimentos independientes (n=24). T-test, $p < 0,05$.

4. Efecto de sacarosa sobre la desmineralización del esmalte dental en biopelículas mono especies de *C. albicans*.

En cuanto al porcentaje de desmineralización (Figura 5), los bloques de esmalte expuestos a la condición con sacarosa presentaron un promedio de $72\% \pm 9,71$ significativamente mayor respecto a la condición control que fue de un $58\% \pm 25,74$ ($p < 0,05$).

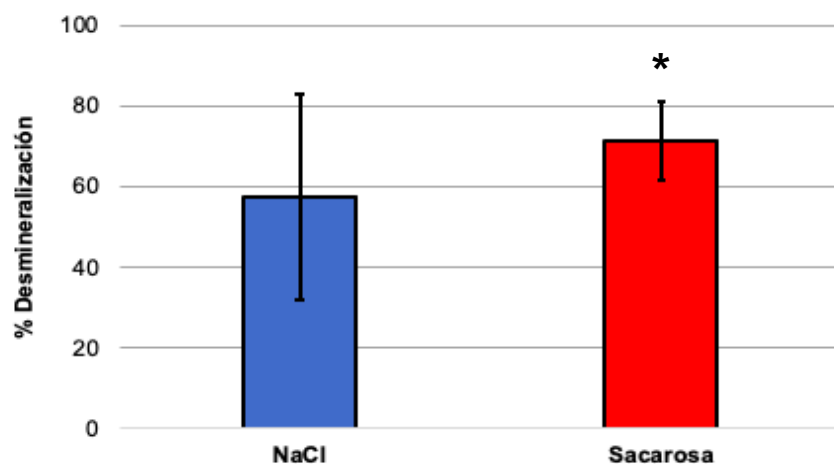
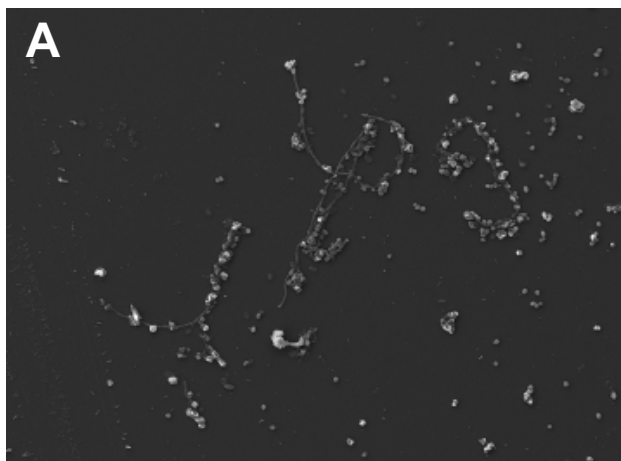


Figura 5. Desmineralización de bloques de esmalte con biopelículas mono especie de *C. albicans* después de la exposición a la condición control o sacarosa. Se determinó la microdureza superficial en los bloques de esmalte antes y después del experimento y se calculó el porcentaje de desmineralización. Las barras indican el promedio de dos experimentos independientes (n=22). Las barras de error muestran la desviación estándar. T-test, $p < 0,05$.

5. Microfotografías electrónicas de barrido de biopelículas mono especies de *C. albicans*.

En las Figuras 6 y 7 se observan las microfotografías electrónicas de barrido obtenidas de las biopelículas mono especies de la levadura en ambas condiciones experimentales. Cabe destacar que en ambas condiciones no se puede observar la matriz extracelular debido a que las muestras fueron tratadas con glutaraldehído y alcohol en concentración ascendente (desde 50% a 100%) y posteriormente metalizadas con oro o carbono para permitir la observación al microscopio.

La Figura 6 representa la condición expuesta a NaCl en donde podemos observar estructuras de hifas y sus blastosporas, además de algunos grupos de células formando pequeños agregados.



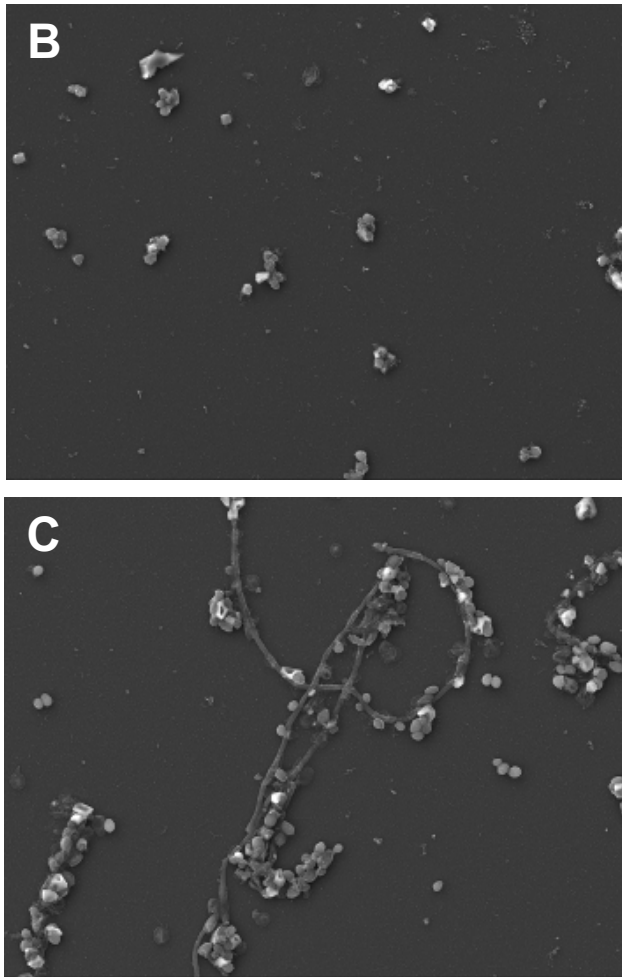


Figura 6. Microfotografías de la estructura de hifas y blastosporas de *C. albicans* en la condición control formando pequeños agregados. Microfotografías capturadas en un microscopio electrónico de barrido con aumento 350X (A), 700X (B) y 800X (C), respectivamente.

La Figura 7 representa la condición expuesta a sacarosa en donde podemos observar mayor cantidad de estructuras hifales y sus blastosporas y coagregación entre ellas, formando una estructura de biopelícula.

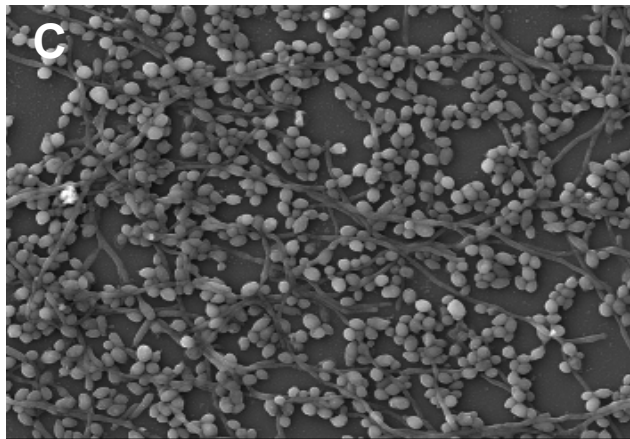
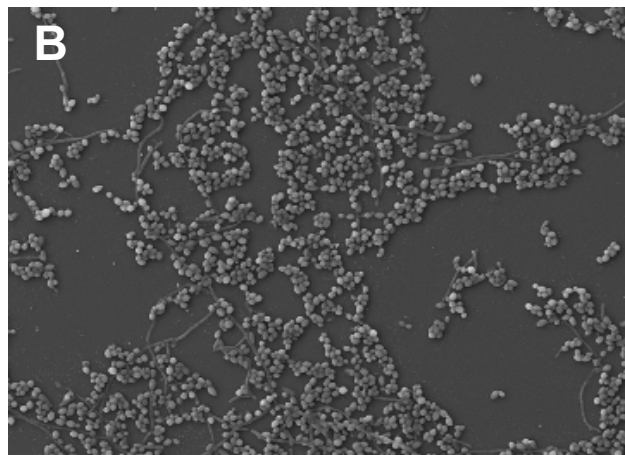
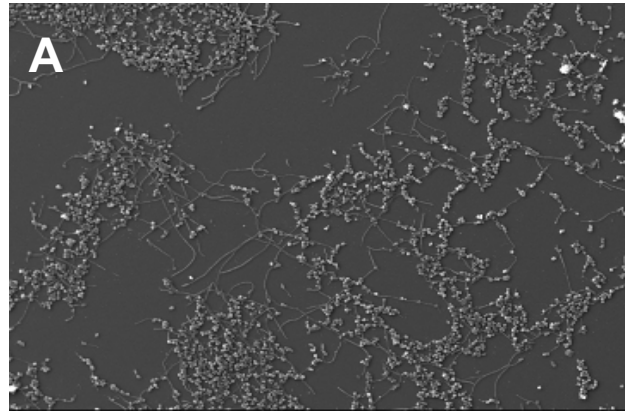


Figura 7. Microfotografías de la estructura de hifas y blastosporas de la levadura en la condición expuesta a sacarosa formando una estructura de biopelícula. Microfotografías capturadas en un microscopio electrónico de barrido con aumento 250X (A), 500X (B) y 1000X (C), respectivamente.

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la formación de biopelículas de un aislado clínico oral de la levadura *C. albicans* en un modelo de caries *in vitro*, en donde uno de los parámetros que se analizó fue el recuento de células viables, bajo una condición de exceso y limitación de azúcar. En la Figura 2, se pudo observar el recuento de células viables de la levadura donde tendió a ser mayor en la condición de sacarosa respecto a la condición control, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

En la investigación de Cavalcanti y cols. (2016) se observó que la levadura aumenta su viabilidad en cultivos de más de una especie bacteriana, ya que hubo mayor recuento de células viables y expresión de hifas de *C. albicans* en cultivos de biopelículas mixtas respecto a biopelículas de mono especies. Por otro lado, Willems y cols. (2016) también evaluaron el recuento de células viables de la levadura en la formación de tres tipos de biopelículas (*C. albicans* + *S. mutans*, *S. mutans* o *C. albicans*), observando que la biopelícula dual y la biopelícula mono especies de *S. mutans* mostraron una cantidad aumentada de células viables en comparación a la biopelícula mono especies de la levadura.

En el estudio de Lozano y cols. (2017) se determinó que hubo una menor prevalencia y diversidad de especies de *Candida* spp. en individuos libres de lesiones de caries (ICDAS II = 0) respecto a los individuos que presentaban lesiones de caries (ICDAS II = 4-6). Además, proponen que una dieta alta en carbohidratos (como el microambiente cariogénico) contribuiría al aumento de la viabilidad de estas levaduras, actuando como una fuente de nutrientes para éstas. También se ha descrito que cuando *C. albicans* coloniza lesiones de caries radiculares sobreexpresa los genes involucrados en actividad metabólica, transporte de azúcar, tolerancia al stress y regulación de pH, además de aumentar sus recuentos celulares, respecto a *C. albicans* proveniente de superficies radiculares sanas (Revisado en Du y cols., 2021). Existen en la literatura un sinnúmero de

publicaciones en donde se demuestra que la viabilidad de esta levadura es significativamente mayor en ambientes con exceso de azúcares fermentables (imitan una condición cariogénica) en comparación a ambientes asociados a salud oral (Aitken y cols., 2018; Baraniya y cols., 2020; Du y cols., 2022). Lo anterior se correlaciona con los resultados de nuestra investigación, donde en la condición control (caries negativa) hubo menor viabilidad de la levadura que en la condición con sacarosa, aunque no se obtuvieron diferencias significativas

Sin embargo, Do Rosario Palma y cols. (2019) realizaron un estudio *in vitro* sobre la influencia de *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguinis* en la viabilidad de *C. albicans*, cuyos resultados indicaron una disminución en el recuento de células viables de la levadura en biopelículas duales. El estudio mencionado se contrapone a lo obtenido por Cavalcanti y Lozano descritos anteriormente.

Estudios recientes de Ren y cols. (2022) revelaron que agrupaciones de la bacteria *S. mutans* se unen dentro de una red formada por la levadura *C. albicans* que, a través de sus hifas y exopolisacáridos, forman una especie de ensamblado. Este ensamblado entre dominios ejerce distintas funciones, como influir en una mayor colonización de la superficie y tasa de crecimiento, mayor tolerancia a los antimicrobianos y mejor resistencia a la deformación de la biopelícula dual, en comparación con cualquiera de los dos microorganismos como biopelículas mono especie. En otras palabras, la levadura proporciona nuevos sitios de adhesión para *S. mutans* a través de sus hifas (Falsetta y cols., 2014).

En resumen, según los resultados de esta investigación y los artículos mencionados anteriormente, la viabilidad de *C. albicans* es baja en biopelículas mono especie y en ambientes con concentraciones de azúcares basales (asociados a salud oral), por lo que es posible que esta levadura se vea beneficiada en presencia de otros microorganismos orales y en azúcares cariogénicos.

Con respecto a la filamentación, la morfogénesis es uno de los factores de virulencia y es un rasgo característico de *C. albicans*. La movilidad está dirigida por la filamentación fúngica a medida que las hifas se extienden y contactan con la superficie. Los cambios en el microambiente, por ejemplo, la exposición a fuentes de carbono y pH tienen un impacto significativo en la virulencia de esta levadura.

Vylkova y cols. (2011) demostraron que *C. albicans* neutraliza los medios con pH ácido. En condiciones ácidas, esta especie puede elevar el pH, lo que da como resultado la autoinducción de la transición levadura-hifa, un rasgo crítico de virulencia. La alcalinización está relacionada con la privación de carbono, ya que ocurre en medios pobres en glucosa.

En la Figura 3, se observó una tendencia a una mayor cantidad de hifas en la condición control que en la condición con sacarosa, sin embargo, no hay una diferencia significativa entre ambas condiciones. Esto se puede explicar con los estudios realizados por Merino y cols. (2011) donde se demostró que *C. albicans* tiene la capacidad de desarrollar biopelículas bajo un intervalo amplio de pH que va desde 4,4 hasta 7,4, lo cual estaría demostrando que la levadura también es capaz de desarrollar filamentación en pH ácidos. Sin embargo, se ha demostrado que el pH óptimo para el crecimiento de la levadura se encuentra en el intervalo de 4,5 a 5,6 (Ombrella y cols., 2008; Merino y cols., 2011).

Además, se ha descrito que las células de *C. albicans* privadas de nutrientes metabolizan los aminoácidos como fuente de carbono, excretando el nitrógeno amino como amonio para elevar el pH del medio y estimular la morfogénesis, contribuyendo así directamente a la patogénesis (Wall y cols., 2019).

Morse y cols. (2019) demostraron que las biopelículas que solo contenían *C. albicans* tenían una producción limitada de hifas, sin embargo, el desarrollo de éstas aumentaron significativamente cuando en las biopelículas estaban presentes bacterias orales (*S. sanguinis*, *S. gordonii*, *A. odontolyticus* y *A. viscosus*). Algo

semejante ocurrió en los experimentos de Do Rosario Palma y cols. (2019) quienes observaron una similar filamentación de la levadura cuando interactúa con *S. sanguinis*, no así con *S. mitis* en donde se observó una inhibición de su filamentación. Sin embargo, la interacción de *S. mitis* en biopelículas mixtas con *C. albicans*, estimula mayormente sus factores de virulencia que cuando la levadura se encuentra con *S. sanguinis*.

Con todo lo mencionado, se puede concluir que, al parecer tanto el pH como la presencia de bacterias (al menos las descritas) son claves para el proceso de filamentación y patogenicidad de la levadura. En nuestros experimentos se demostró que la filamentación ocurrió en ambas condiciones (NaCl y sacarosa), ya que como se mencionó anteriormente la levadura tiene la capacidad de desarrollar biopelículas en diferentes pH y, es posible también especular que las bacterias benefician el proceso de filamentación.

Los parámetros biológicos previamente mencionados, se visualizaron mediante microscopía electrónica de barrido, donde se observaron las células de la levadura y sus estructuras filamentosas en forma de hifas en las condiciones ambientales utilizadas en este estudio (Figuras 6 y 7). Debido al procesamiento de las muestras, previo a la observación al microscopio (indicado en la metodología), no se conserva la matriz extracelular, por lo tanto, no es una metodología optimizada para comprender la complejidad de la biopelícula de *C. albicans*. Las observaciones al microscopio solo fueron descripciones cualitativas. Aun así, aunque no hubo diferencias significativas en el recuento de hifas y células viables entre ambas condiciones experimentales, sí se observó en las imágenes mayor cantidad de ambos parámetros evaluados en la condición con sacarosa. Cabe destacar que las imágenes mostradas en las figuras indicadas son representativas de la biopelícula mono especie de la levadura en toda su extensión.

Si quisiéramos visualizar la estructura de la biopelícula de la levadura, incluida su matriz extracelular, se podría utilizar microscopía invertida, microscopía de barrido láser confocal o la criofijación, los cuales son métodos indicados para la preparación

de muestras para estudiar biopelículas fúngicas, ya que permiten la visualización de la MEC y la exploración de la estructura de la biopelícula en su totalidad (Vila y cols., 2017).

En cuanto a la acidogenicidad, una dieta alta en carbohidratos es una fuente rica de nutrientes para *Candida* spp., la cual genera productos ácidos a través de la fermentación. Esto se puede evidenciar en la Figura 4, donde a partir de las 30 h hasta el término del experimento hubo una disminución significativa del pH en la condición con sacarosa, donde el valor más bajo observado fue de $4,18 \pm 0,42$, no así en la condición control donde se obtuvieron valores de pH en un rango entre $5,25 \pm 0,33$ y $5,89 \pm 0,08$. Es importante mencionar que el pH del medio YNB suplementado con 0,1 mM de glucosa presenta un valor de pH de 5,53.

Pereira y cols. (2018) explican de manera independiente el metabolismo de *C. albicans* y *S. mutans* en presencia de sacarosa, verificando que la levadura como no tiene la enzima lactato deshidrogenasa no puede convertir piruvato en ácido láctico, pero produce otros ácidos orgánicos como el acético, málico y fórmico, los cuales podrían contribuir a la acidez característica de un microambiente cariogénico.

Laís y cols. (2020) describieron que, aunque un ambiente cariogénico está relacionado con condiciones de pH bajo, la producción excesiva de ácidos podría afectar el proceso de filamentación a la hora de formar la biopelícula de la levadura.

Según el estudio de Willems y cols. (2016), cuando la levadura forma biopelículas mono especie *in vitro*, éstas no se observaron afectadas drásticamente por el pH del medio de cultivo, sin embargo, esto es distinto en biopelículas duales de *C. albicans* con *S. mutans*, donde se observaron valores de pH levemente más bajos, siendo la acidogenicidad aún más baja en biopelículas mono especie de *S. mutans*. Los autores postulan que la levadura no es un microorganismo cariogénico en presencia de *S. mutans*, ya que impulsa metabólicamente la alcalinización dentro de la biopelícula dual, posiblemente por el consumo de ácido láctico (fuente de

carbono no fermentable) por disminución del azúcar en el medio (cambiando desde un metabolismo fermentable a un metabolismo aeróbico), lo que, a su vez, disminuiría la desmineralización de la hidroxiapatita.

Es posible mediante estos datos comentar que *C. albicans* por un lado contribuye al mantenimiento de un pH salival bajo (acidez) en un microambiente cariogénico (exceso de azúcar) y, por otro lado, la levadura en presencia de un medio de cultivo y bacterias, ambos cariogénicos, tiene la capacidad de elevar el pH de la biopelícula disminuyendo de esta manera la acidogenicidad.

Como se ha planteado antes, *C. albicans* está fuertemente asociada a lesiones de caries severas en niños, sin embargo, el papel de sus enzimas (proteasas) extracelulares (aspartil proteinasas, fosfolipasas, lipasas) que secreta durante el proceso aún no están claros. Los resultados de Li y cols. (2014) explican que las actividades de estas enzimas fueron significativamente más altas en el grupo con lesiones de caries severas respecto al grupo libre de lesiones de caries.

Dentro de la cavidad oral, *S. mutans* se considera una de las bacterias más cariogénicas, pero se ha sugerido que *C. albicans* también podría influir en el desarrollo de caries. Sin embargo, el efecto de esta combinación de microorganismos de distinta naturaleza sobre la lesión de caries en dentina no ha sido evaluado experimentalmente. No obstante, Sampaio y cols. (2019) deciden estudiar esta interacción. Ellos demuestran que la levadura fomenta el potencial cariogénico de la biopelícula de *S. mutans*, aumentando la desmineralización de la dentina. Todo esto se explica porque la biopelícula dual de *C. albicans* + *S. mutans* es más voluminosa que la biopelícula mono especie de *S. mutans*. Además, las células de *S. mutans* interactúan con *C. albicans* a través de los polisacáridos de la matriz de la biopelícula.

Falsetta y cols. (2014) también investigaron la interacción entre *S. mutans* y *C. albicans*. Sus resultados indicaron que los roedores infectados con ambos

microorganismos presentaron lesiones de caries moderadas a severas donde se expone la dentina subyacente. En los animales infectados solamente con *S. mutans*, se detectaron grandes áreas de lesiones iniciales, sin embargo, menos graves que los animales co-infectados. En cambio, en los animales infectados solamente con *C. albicans*, se observaron pequeñas áreas de desmineralización y lesiones iniciales.

Según la Figura 5 de nuestros experimentos, los bloques de esmalte expuestos a la condición de sacarosa presentaron un porcentaje de desmineralización de un $72\% \pm 9,71$, significativamente mayor que el obtenido en la condición control que fue de $58\% \pm 25,74$. Lo que nos permite especular que, *C. albicans* cuando se encuentra expuesta a un ambiente de pH ácido como el que genera la condición de sacarosa, puede influir en el proceso de lesiones de caries. Respecto a lo anterior, en el estudio de Brandi y cols. (2016) se realizó un diseño experimental similar al nuestro e investigaron el potencial de desmineralización de bloques de esmalte con biopelículas de *C. albicans* o *C. parapsilosis* obtenidas de placa dental de niños preescolares con y libres de lesiones de caries. Interesantemente, los resultados demostraron que hubo desmineralización en los bloques de esmalte donde se desarrollaron las biopelículas mono especie de ambos aislados independiente de donde provienen, e incluso ésta fue levemente mayor en los aislados provenientes de la condición libres de lesiones de caries.

Finalmente, el rol de *C. albicans* dentro del proceso de lesiones de caries podría depender de la condición que presenta el microambiente, tales como la mayor o menor prevalencia de ciertos grupos de microorganismos y rangos de pH. Lo anterior unido a que también se podría ver influenciado por la concentración de azúcares (sacarosa), es decir a mayor dosis de ésta, mayor porcentaje de desmineralización (Díaz-Garrido y cols., 2016).

Nuestros resultados, aunque son preliminares, son un pequeño avance para poder obtener una total comprensión del rol que cumple *C. albicans* en la complejidad de

la biopelícula dental coexistiendo con diversos microorganismos, tanto en salud como en enfermedad oral.

Como una proyección de este trabajo, se debe considerar complementar el diseño experimental bajo el modelo de caries *in vitro* utilizado con la presencia de bacterias, es decir, biopelículas mixtas duales o polimicrobianas. De esta manera se podrán plantear nuevas y mejoradas estrategias preventivas y terapéuticas contra la enfermedad de caries basadas no solo en objetivos bacterianos, sino también en la inclusión de hongos en las biopelículas orales.

VIII. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos nos indican que hay contribución del aislado clínico oral de *C. albicans* en el proceso de formación de caries dental cuando el ambiente es cariogénico, ya que la levadura no se ve afectada en su viabilidad o filamentación, ya sea por el pH y/o exceso de azúcar. Por lo que la levadura contribuiría al mantenimiento de un pH salival bajo (acidez), el cual está asociado con una mayor desmineralización del esmalte dental, lo que conlleva al desarrollo de lesiones de caries.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitken-Saavedra J, Lund R, González J, Huenchunao R, Perez-Vallespir I y cols. Diversity, frequency and antifungal resistance of *Candida* species in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Odontol Scand.* 2018;76(8):580-586.

Baraniya D, Chen T, Nahar A, Alakwaa F, Hill J, Tellez M y cols. Supragingival mycobiome and inter-kingdom interactions in dental caries. *J Oral Microbiol.* 2020;12:1729305-1729313.

Brandi T, Portela M, Lima P, Castro G, Maia L, Fonseca-Gonçalves A. Demineralizing potential of dental *biofilm* added with *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* isolated from preschool children with and without caries. *Microb Pathog.* 2016;100:51-55.

Buscher J, Van der Meri H. Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. *Soc Gen Microbiol.* 2000;59:25-36.

Cao L, Zhang Z-Z, Xu S-B, Ma M, Wei X. Farnesol inhibits development of caries by augmenting oxygen sensitivity and suppressing virulence-associated gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Biomed Res.* 2017;31(4):333-343.

Cavalcanti IMG, Nobbs AH, Ricomini-Filho AP, Jenkinson HF, Del Bel Cury AA. Interkingdom cooperation between *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* and *Actinomyces oris* modulates early *biofilm* development on denture material. *Pathog Dis.* 2016;74(3):2-8.

Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA. *S. mutans biofilm* model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2010;24:135-141.

Chen T, Yu W-H, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. Database (Oxford). 2010;10:baq013-6.

Cruz Quintana SM, Díaz Sjostrom P, Arias Socarrás D, Mazón Baldeón GM. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev Cubana Estomatol. 2017;54(1):84-99.

DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. Inflamm Bowel Dis. 2016;22(5):1137-1150.

De La Calle Rodríguez N, Santa Vélez C, Cardona Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. CES Med. 2012;26(1):43-55.

De Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJO, de Sousa Cartágenes M do S, Filho AKDB y cols. *Candida* infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. Front Microbiol. 2018;9:1351-9.

Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a *biofilm*-caries model. Eur J Dent. 2016;10(3):345-350.

Do Rosário Palma AL, Domingues N, de Barros PP, Brito GNB, Jorge AOC. Influence of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguinis* on virulence of *Candida albicans*: in vitro and in vivo studies. Folia Microbiol (Praha). 2019;64(2):215-222.

Du Q, Ren B, He J, Peng X, Guo Q, Zheng L y cols. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. ISME J. 2021;15:894-908.

Du Q, Ren B, Zhou X, Zhang L, Xu X. Cross-kingdom interaction between *Candida albicans* and oral bacteria. *Front Microbiol.* 2022;13:911623-36.

Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai C-H. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque *biofilms* in vivo. *Infect Immun.* 2014;82(5):1968-1981.

Farkash Y, Feldman M, Ginsburg I, Steinberg D, Shalish M. Polyphenols Inhibit *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* *Biofilm* Formation. *Dent J.* 2019;7(2):1-42.

Fuentes M, Hermosilla G, Alburquenque C, Falconer M, Amaro J, Tapia C. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. *Rev Chil Infectol.* 2014;31(5):511-517.

Harriott M, Noverr M. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial *biofilms* in disease. *Cell Rev Trends in Microbiol.* 2011;19(11):557-563.

Hosainzadegan H, Khalilov R, Gholizadeh P. The necessity to revise Koch's postulates and its application to infectious and non-infectious diseases: a mini-review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(2):215-8.

Kadosh D. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2019;52:27-34.

Laís D, Damé-Teixeira N, Do T, Maltz M, Parolo CCF. The role of *Candida albicans* in root caries *biofilms*: an RNA-seq analysis. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:1-10.

Li W, Yu D, Gao S, Lin J, Chen Z, Zhao W. Role of *Candida albicans*-secreted aspartyl proteinases (Saps) in severe early childhood caries. *Int J Mol Sci.* 2014;15(6):10766-79.

Lozano Moraga CP, Rodríguez Martínez GA, Lefimil Puente CA, Morales Bozo IC, Urzúa Orellana BR. Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. *Acta Odontol Scand.* 2017;75(1):30-5.

Lozano CP, Díaz-Garrido N, Kreth J, Giacaman RA. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* Expression of Competition-Related Genes, Under Sucrose. *Caries Res.* 2019;53(2):194-203.

Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A y cols. Terminology of dental caries and dental caries management: Consensus report of a workshop organized by orca and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7–14.

Merino Guzmán G, Cedillo Ramírez L, Silva Andrade F, Muñoz García AA, Castañeda Roldán EI. Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica. *Rev Mex Micol.* 2011;33:1-8.

MINSAL, 2018. Diagnóstico de situación de salud bucal. [citado el 4 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.minsal.cl/portal/url/item/7dc33df0bb34ec58e04001011e011c36.pdf>.

Morse DJ, Wilson MJ, Wei X, Bradshaw DJ, Lewis MAO, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence in in vitro *biofilms* by oral bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2019;68(4):337-43.

Negrini T de C, Koo H, Arthur RA. *Candida*-bacterial *biofilms* and host-microbe interactions in oral diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1197:119-141.

Núñez H, Ulloa MT, Guerra F, Osorio C. Pathogenicity island region of clinical and environmental strains of *Vibrio parahaemolyticus*, isolated in Chile. Rev Med Chile. 2009;137(2):208-214.

Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. Caries Res. 2013;47(2):89-102.

Ombrella AM, Racca L, Ramos L. Actividades proteínasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales. Rev Iberoam Micol. 2008; 25(1):12-16.

Oviedo J, Lavado R, Briceño E. Influencia del pH en las relaciones microbianas de la cavidad bucal. Revisión bibliográfica. Acta Odontol Venez. 2014;52(2):1-14.

Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranayake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen?. Oral Dis. 2018;24(4):518-526.

Pitts N, Domenick Z, Marsh P, Ekstrand K, Weintraub J, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. Nature Rev Dis Primers. 2017;3:17-30.

Ren Z, Jeckel H, Simon-Soro A, Xiang Z, Liu Y, Cavalcanti IM y cols. Interkingdom assemblages in human saliva display group-level surface mobility and disease-promoting emergent functions. Proc Natl Acad Sci USA. 2022;119(41):10-73.

Rojas AE, Pérez JE, Hernández JS, Zapata Y. Análisis cuantitativo de la expresión de genes de resistencia a fluconazol en cepas de *Candida albicans* aisladas al ingreso de adultos mayores a una unidad de cuidados intensivos de Manizales, Colombia. Biomedica. 2020;40(1):153-165.

Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet?. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:92-16.

Sampaio AA, Souza SE, Ricomini-Filho AP, Del Bel Cury AA, Cavalcanti YW, Cury JA. *Candida albicans* Increases Dentine Demineralization Provoked by *Streptococcus mutans* Biofilm. *Caries Res.* 2019;53(3):322-31.

Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015;23(2):76-82.

Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014;63(2):127-35.

Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008;42(6):409-18.

Vila T, Fonseca BB, DA Cunha MML, Dos Santos GRC, Ishida K, Barreto-Bergter E y cols. *Candida albicans* biofilms: comparative analysis of room-temperature and cryofixation for scanning electron microscopy: *Candida albicans* biofilms. *J Microsc.* 2017;267(3):409-19.

Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio.* 2011;2(3):e00055-11.

Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2019;52:1-6.

Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP. *Candida albicans* in oral *biofilms* could prevent caries. Pathog Dis. 2016;74(5):ftw039-6.

X. ANEXOS

X.1 Proyecto PRI-ODO 2020/08



Santiago, 01 de Julio de 2020

MAT.: Evaluación Proyecto PRI-ODO.


Profesora
Dra. Carla Lozano
Investigadora Responsable PRI-ODO
Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
Facultad de Odontología
P R E S E N T E

Estimada Dra. Lozano:

Informo a usted que, la Dirección de Investigación ha evaluado su proyecto PRIODO titulado: "*Candida albicans and Streptococcus sanguinis: competition or synergism in the dental biofilm?*" y ha decidido **APROBAR** su propuesta. De todas maneras, los revisores hacen ciertas sugerencias que esperamos que pueda considerar para mejorar el proyecto.

Se otorga Código DIFO una vez nos haga llegar las certificaciones del Comité de Bioseguridad y/o Comité de ética humana, si fuera necesario.
Adjuntamos los comentarios del comité revisor.

Saluda atentamente a usted,



Dr. Alfredo Molina Berrios
Director de Investigación
Facultad de Odontología Universidad de Chile

AMB/rcm.

X.2 Proyecto FIOUCH



Santiago, 29 de agosto de 2022

Ref.: Proyecto FIOUCH 0322

Dra. Carla Lozano
Facultad de Odontología
Universidad de Chile
PRESENTE

Estimado Dra. Lozano, en representación de la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (DIFO), le informamos que ha sido adjudicado su proyecto postulado al concurso FIOUCH 2022. Reciba nuestras sinceras felicitaciones por el éxito de su postulación.

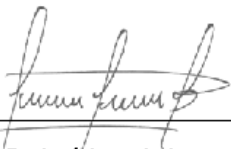
En esta convocatoria concursaron 16 proyectos elegibles para financiamiento y se financiaron 5 (31,2%). Su proyecto obtuvo un puntaje de 4,55 y se ubicó en el lugar n°3. El último proyecto financiado obtuvo 4,40 puntos.

Adjuntamos a la presente un informe del proceso de evaluación y las calificaciones que obtuvo su proyecto.

Le recordamos que de acuerdo con lo estipulado a las bases FIOUCH 2022, la DIFO se reserva el derecho de solicitar modificaciones metodológicas y/o realizar modificaciones al presupuesto solicitado. En esta oportunidad, La Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología junto al Comité Revisor DIFO ha aprobado financiar su propuesta por un monto de: 200 UF.

El convenio de financiamiento que deberá firmar usted y la representante legal de la Facultad de Odontología, será enviado a la brevedad. Los recursos aprobados para la ejecución de su proyecto estarán disponibles para su uso a través de un centro de costos asignado por la Dirección Económica y Administrativa y sólo si no existen compromisos o situaciones pendientes de cumplir con la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología.

Saluda atentamente a Ud,



Dr. José Antonio Jara
Coordinador FIOUCH 2022
Facultad de Odontología
Universidad de Chile

X.3 Certificado BSG



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N° 164

Santiago, 15 de diciembre de 2022.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación FIOUCH 0322 titulado “***Candida albicans* y *Streptococcus sanguinis*: ¿Competencia o sinergismo en el *biofilms* dental?**”. La Investigadora Responsable de este proyecto es la Dra. Carla Lozano Moraga, Académica del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile (FOUCH).

Los ensayos propuestos en este Proyecto son aquellos que se realizarán en la Unidad Académica mencionada anteriormente e involucran el manejo de:

- **Sustancias Químicas Peligrosas:**

- Se utilizarán agentes químicos de riesgo de tipo irritante, oxidante, tóxico agudo, corrosivo y peligros para la salud y medio ambiente.

- **Material Biológico:**

- Saliva proveniente de sujetos sanos oralmente.

- **Patógenos:**

- Las bacterias Gram positivo *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus sanguinis* SK36, pertenecientes al Grupo de Riesgo 1 y 2, respectivamente.
- Aislados clínicos orales (provenientes de saliva) de la levadura *Candida albicans*, pertenecientes al Grupo de Riesgo 1.

Los ensayos se realizarán en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral en donde desarrolla sus investigaciones la Dra. Lozano.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados, Conicyt 2018. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad junto al Manual de Procedimientos para el Manejo y Desechos de Residuos biológicos y RESPEL de la Facultad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Lozano para ser presentado en la Dirección de Investigación de la FOUCH.



Dr. Mario Chiong
Secretario